

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002933

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE

Number: 10 2004 014 280.7

Filing date: 22 March 2004 (22.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 01 April 2005 (01.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 10 2004 014 280.7

Anmeldetag: 22. März 2004

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Aminosäuren mittels eines Ganzzellkatalysators

IPC: C 12 P, C 12 N

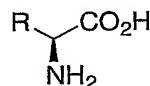
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. Februar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, which appears to read "D. Böker", is placed over a horizontal line. The signature is fluid and cursive, with "D." on the left and "Böker" on the right.

**Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Aminosäuren
mittels eines Ganzzellkatalysators**

Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung optisch aktiver L- α -Aminosäuren. Insbesondere beschreibt 5 die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



(I),

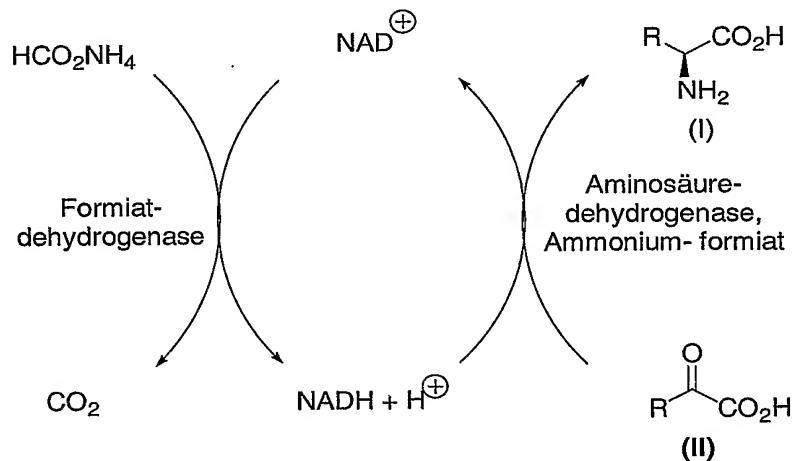
10 worin R für Alkyl, insbesondere eine raumerfüllende, verzweigte, ein tertiäres C-Atom aufweisende Alkylgruppe mit 5-10 C-Atomen, beispielsweise tert-Butyl, und substituierte Alkyl steht, bzw. daraus abgeleiteter Salze.

Optisch aktive L- α -Aminosäuren werden zur Herstellung einer 15 Reihe wertvoller Verbindungen eingesetzt. Beispielsweise fungieren diese Verbindungen als Intermediate bei der Herstellung von Pharmazeutika. Einen besonders wertvollen Vertreter dieser Produktklasse stellt L-tert-Leucin dar, das als Strukturelement in einer Reihe von Pharmawirkstoffen zu finden ist und demzufolge als Intermediat für die Synthese der entsprechenden Pharmawirkstoffe benötigt wird. Beispiele für Anwendungen von L-tert-Leucin als Baustein für Pharmawirkstoffe sind in A. S. Bommarius et al. (J. Mol. Cat. B: Enzymatic 1998, 5, 1-11) gegeben.

25 Die enzymatische Reduktion von 2-Ketocarbonsäuren mittels einer Leucindehydogenase und einer Formiatdehydogenase aus *Candida boidinii* unter in situ-Cofaktorregenerierung stellt eine technisch etablierte Methode zur Herstellung optisch aktiver L- α -Aminosäuren dar. Insbesondere eignet sich 30 dieser Weg zur Herstellung der nichtproteinogenen Aminosäure L-tert-Leucin, die im Tonnenmaßstab mit dieser

biokatalytischen Methode produziert wird. Das Verfahren ist eingehend in der Literatur beschrieben (EP0692538; U. Kragl, D. Vasic-Racki, C. Wandrey, Bioprocess Engineering 1996, 14, 291-297; A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, J. Mol. Cat. B: Enzymatic 1998, 5, 1-11; G. Krix, A. S. Bommarius, K. Kottenhahn, M. Schwarm, M.-R. Kula, J. Biotechnol. 1997, 53, 29-39, A. Liese, C. Wandrey, A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, Industrial Biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, S. 125f. und A. S. Bommarius, K. Drauz, W. Hummel, M.-R. Kula, C. Wandrey, Biocatalysis 1994, 10, 37-47. Eine allgemeine Übersicht ist zudem in A. S. Bommarius in: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Band 2, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, Kapitel 15.3, S. 1047f. gegeben).

15



Schema 1. Herstellung von L-tert-Leucin mit isolierten Enzymen und zugesetztem Cofaktor (am Beispiel einer NAD^+ -abhängigen Aminosäuredehydrogenase und einer Formiatdehydrogenase zur Cofaktorregenerierung)

Typische verwendete NAD^+ -Cofaktormengen, die zugesetzt werden müssen, sind beispielsweise in EP0692538 beschrieben und liegen im Bereich von 0.0008 Äquivalenten bis 0.02 Äquivalenten. Zudem beschreiben G. Krix et al. (J. Biotechnol. 1997, 53, 29-39) die Herstellung von (S)-

Neopentylglycin in technischen Ansatzgrößen unter Einsatz einer NAD⁺-Cofaktormenge von 0.003 Äquivalenten. Typische Substratkonzentrationen in EP0692538 liegen bei 100 – 250 mM. In A. Liese et al. (Industrial Biotransformations, 5 Wiley-VCH, Weinheim, 2000, S. 125f.) ist die Herstellung von L-tert-Leucin mit einer Substratkonzentration von 0.5 M und einer Ausbeute von 74% beschrieben. Die Durchführung von reduktiven Aminierungen mit isolierten Leucin-dehydrogenase und Formiatdehydrogenase-Enzymen bei Substratkonzentrationen von 0.5 bis 1 M ist ebenfalls in G. Krix et al. (J. Biotechnol. 10 1997, 53, 29-39) beschrieben.

Vorteilhaft bei diesem Verfahren sind die hohen Umsätze und hervorragenden Enantioselektivitäten, die bei >99% ee liegen und somit die strengen Qualitätsanforderungen an 15 Pharmaintermediate erfüllen helfen. Auch kann bei hohen Substratkonzentrationen gearbeitet werden, was gerade aus technischer Sicht ein bedeutender Aspekt ist.

Nachteilig beim bisherigen Verfahren ist allerdings zum einen der Bedarf an isolierten Enzymen. Diese werden 20 insbesondere in gereinigter Form eingesetzt, einhergehend mit einer Erhöhung des Biokatalysatorkostenanteils. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Enzymkosten ist ein vielfaches Recycling der Enzyme notwendig, um eine günstige Prozessökonomie, insbesondere niedrige Enzymkosten, zu erhalten. Neben den langen Laufzeiten solcher 25 Recyclingverfahren, die vorteilhaft in kontinuierlicher Form durchgeführt werden, sind auch die daraus resultierenden relativ kleinen Reaktionsvolumina pro Ansatz nachteilig.

Ein weiterer Nachteil ist der Bedarf an Cofaktor, der bei 30 der Reaktion zugesetzt wird. Solche Cofaktoren werden zwar nur katalytisch eingesetzt in Größenordnungen von ca. 0.001 Äquivalenten, stellen trotzdem aber aufgrund ihres hohen Preises selbst bei katalytischen Mengen einen erheblichen Kostenfaktor dar.

Wünschenswert wäre deshalb ein Verfahren, bei dem die Notwendigkeit des Einsatzes von isolierten Enzymen sowie des Zusatzes an Cofaktor entfällt bzw. der Zusatz an Cofaktor minimiert ist und die Synthese nichtsdestotrotz mit hoher

5 Umsatzrate, hoher Enantioselektivität und hoher volumetrischer Produktivität verläuft. Auf diesem Wege könnten die Enzymkosten in nennenswerter Weise gesenkt, Cofaktorkosten eingespart und somit die Prozessökonomie gesteigert werden.

10 Soda et al. beschreiben die Verwendung eines Ganzzellkatalysators, enthaltend eine Leucin-dehydrogenase und eine bakterielle Formiatdehydrogenase, in der reduktiven Aminierung von unter anderem verzweigt-kettige α -Ketocarbonsäuren wie L-tert-Leucin (Appl. Environm.

15 Microbiology 1997, 63, 4651-4656.). Es wird explizit in dieser Veröffentlichung darauf hingewiesen, dass die bei der reduktiven Aminierung benötigten Enzyme in Form eines diese Enzyme aufweisenden Ganzzellkatalysators, insbesondere E. coli, als lebende oder "resting cells" eingesetzt werden können. Sofern man jedoch den intrazellularen Pool in E. coli an NAD⁺ zwecks Vermeidung dessen Zugabe sich zunutze machen möchte, ist man auf eine finale Konzentration an Produkt von etwa 0,3 M beschränkt. Dies ist für technische Anwendungen nicht ausreichend genug.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Angabe eines weiteren enzymatisch arbeitenden Verfahrens zur Herstellung von L- α -Aminosäuren, welches vorteilhafterweise in technischem Maßstab durchgeführt werden kann. Es sollte insbesondere in den eben geschilderten Aspekten den 30 Verfahren des Standes der Technik überlegen sein und es erlauben, die gewünschten Produkte unter prozessökonomischen Gesichtspunkten (insbesondere Raumzeitausbeute) vorteilhaft herzustellen.

Diese und weitere nicht näher spezifizierte sich jedoch aus 35 dem Stand der Technik in naheliegender Weise ergebende

Aufgaben werden durch ein Verfahren mit den Merkmalen des vorliegenden Anspruchs 1 gelöst. Ansprüche 2 bis 9 sind auf bevorzugte Ausführungsformen des gegenständlichen Verfahrens gerichtet.

5 Dadurch, dass man in einem Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten L- α -Aminosäuren oder deren Salzen durch Umsetzen der entsprechenden 2-Ketocarbonsäure mit einem Ammoniumionen-Donor in Gegenwart eines Ganzzellkatalysators aufweisend ein kloniertes Gen kodierend für eine Cofaktor-abhängige Aminosäuredehydrogenase und ein kloniertes Gen kodierend für ein den Cofaktor regenerierendes Enzym bei einer Gesamteinsatzmenge an Substrat pro Reaktionsvolumen von ≥ 500 mM die Zugabe des Substrats so dosiert, dass die stationäre Konzentration an 10 15 20 25 30 35 2-Ketocarbonsäure unter 500 mM liegt und die externe Zugabe an Cofaktor bezogen auf die Gesamteinsatzmenge an Substrat $< 0,0001$ Äquivalenten entspricht, gelangt man in äußerst eleganter und überraschender dafür aber nicht minder vorteilhafter Art und Weise zur Lösung der gestellten Aufgabe.

Überraschenderweise gelingt es beispielsweise durch den Einsatz des Ganzzellkatalysators bei gleichzeitiger Dosierung des Substrats auf einen Zusatz des teuren Cofaktors zu verzichten bzw. durch minimale externe Zugabe (<0.0001 Äquivalenten) dessen Konzentrationen in einem geringen Bereich zu halten, was Prozesseinsatzkosten sparen hilft. Im Gegensatz dazu gelingt ohne diese Dosiertechnologie bei Vorlage von Substratmengen pro Reaktionsvolumina von >500 mM die reduktive Aminierung mit dem Ganzzellkatalysator nur, wenn größere Mengen des Cofaktors NAD⁺ zugesetzt werden. In dessen Abwesenheit verläuft die Konzentration nur unbefriedigend (siehe Vergleichsbeispiel „Synthesebeispiel 1“ Anfangssubstratmenge pro Reaktionsvolumina 900 mM – Endumsatz 25%). Erst durch das erfindungsgemäße Verfahren (siehe Synthesebeispiel 2 bis 4) gelingt es somit, auf den externen Zusatz des Cofaktors

auch bei der Durchführung der Synthese mit höheren Gesamtumsatzmengen pro Reaktionsvolumina und damit bei prozessökonomisch sinnvollen Bedingungen fast vollständig verzichten zu können.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform wird demnach der teure Cofaktor nur in solchen Mengen zugegeben, dass eine Konzentration von vorzugsweise <0,00005 Äquivalenten, äußerst bevorzugt <0,00001 Äquivalenten bezogen auf das Substrat eingehalten wird. Ganz besonders bevorzugt ist ein

10 Ausführungsform bei der man keinen Cofaktor extern zur Reaktionsmischung hinzufügt. Hier kann also der Zusatz der Cofaktoren (z.B. NAD(H)) zur Gänze unterbleiben, was so aus dem Stand der Technik in naheliegender Weise nicht herleitbar war.

15 Der Fachmann ist im Rahmen der ins Auge gefassten Reaktion frei in der Wahl der Gene kodierend für eine Cofaktor-abhängige Aminosäuredehydrogenase und für ein den Cofaktor regenerierendes Enzyms, die durch den Ganzzellkatalysator als Wirtsorganismus exprimiert werden sollen. Er wird sich 20 an Enzymen, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, orientieren.

25 In Bezug auf die Aminosäuredehydrogenase kommen insbesondere Enzyme ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leucin-dehydrogenasen (US5854035) und Phenylalanin-dehydrogenasen (US5416019) in Frage. Als Aminosäuredehydrogenasen haben sich insbesondere die Leucin-dehydrogenasen als geeignet erwiesen, wobei die Leucin-dehydrogenasen aus *Bacillus*-Stämmen und hier insbesondere aus *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus* (Seq. 30 ID No. 5) und *Bacillus stearothermophilus* im besonderen Maße geeignet sind.

Als den Cofaktor regenerierendes Enzym können solche ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Formiatdehydrogenasen (EP1295937), Malatdehydrogenasen 35 (PCT/EP/03/08631), Lactatdehydrogenasen,

Glucosedehydrogenasen (letztere in A. Bommarius in: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Volume III, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, Kapitel 15.3) ins Auge gefasst werden. Als ganz besonders bevorzugt

5 hat sich die Verwendung einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bzw. daraus resultierender Mutanten (EP1295937; Seq. ID No. 7) unter Einsatz einer Formiat-haltigen Komponente als Substrat erwiesen.

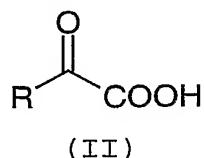
In besonderer Weise ist dabei ein Ganzzellkatalysator, der

10 eine Leucindehydrogenase sowie eine Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* oder daraus abgeleitete Mutanten enthält, geeignet.

Je nach eingesetzter Aminosäuredehydrogenase ist das

15 Substratsspektrum, welches durch den Ganzzellkatalysator umgesetzt wird, unterschiedlich. Während die Leucindehydrogenase mehr für lineare und verzweigte aliphatisch substituierte 2-Ketocarbonsäuren in Frage kommt, wird die Phenylalanindehydrogenase bevorzugt auf aromatische substituierte Substrate angewandt. Im Hinblick auf den

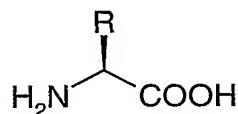
20 Einsatz von Leucindehydrogenase im Ganzzellkatalysator können bevorzugt Substrate der allgemeinen Formel (II) mit aliphatischem Rest R



eingesetzt und umgesetzt werden. Insbesondere kommen solche

25 in Frage, die sperrige aliphatische Reste als R aufweisen. Es sind dies vorrangig solche Reste R ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 1-Adamantyl, Neopentyl und tert-Butyl. Daher ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem man

2-Ketocarbonsäuren oder daraus resultierende Salze einsetzt, die Aminosäuren der allgemeinen Formel (I)



(I)

5 worin R für Alkyl, insbesondere eine raumerfüllende, verzweigte, ein tertiäres C-Atom aufweisende Alkylgruppe mit 5-10 C-Atomen, beispielsweise tert-Butyl, und substituierte Alkyl steht, liefern.

Prinzipiell ist der Fachmann frei in der Art und Weise, wie 10 er den erfindungsgemäßen Prozess durchführt. Er wird sich dabei an Verfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, orientieren. Diese Verfahren können kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Natur sein. Vorteilhaft ist die dosierte Zugabe des Substrats nach einem so genannten 15 Fedbatch-Prozess [siehe beispielsweise Synthesebeispiel 2 und 4] oder durch kontinuierliche Zugabe [siehe beispielsweise Synthesebeispiel 3]. Bei beiden Verfahrensvarianten erfolgt die Substratzugabe so, dass die stationäre Konzentration an Substrat unter 500 mM liegt.

0 Als vorteilhaft hat sich herausgestellt, wenn man die als Substrat eingesetzte 2-Ketocarbonsäure in einer maximalen stationären Konzentration von unter 450 mM und ganz besonders bevorzugt von unter 400 mM während der Reaktion einsetzt.

25 Beim Fedbatch-Verfahren erfolgt die Zugabe von Substrat, vorzugsweise als Substratlösung, portionsweise nach bestimmten Zeiteinheiten. Die Anzahl der zugegebenen Substratportionen liegt vorzugsweise zwischen 3 und 15, ganz bevorzugt zwischen 5 und 9. Die Konzentration der zugegebenen Substratlösung ist vorzugsweise so hoch einzustellen, dass eine möglichst hohe Gesamteinsatzmenge an

Substrat pro Reaktionsvolumen erzielt wird. Beispiele für diese Verfahrensvariante des Fedbacth-Prozesses geben das Synthesebeispiel 2 und 4. Bei der kontinuierlichen Verfahrensvariante erfolgt die Substratzugabe kontinuierlich

5 über einen bestimmten Zeitraum, vorzugsweise mit einer konstanten Dosiergeschwindigkeit, wobei das Substrat vorzugsweise in Form einer Substratlösung zugegeben wird. Ein Beispiel für diese kontinuierliche Verfahrensvariante gibt Synthesebeispiel 3.

10 Für den Ganzzellkatalysator, enthaltend eine Aminosäuredehydrogenase und ein zur Cofaktorregenerierung befähigtes Enzym, eignen sich sämtliche bekannte Zellen. Als Mikroorganismen sind diesbezüglich Organismen wie z.B. Hefen wie *Hansenula polymorpha*, *Pichia* sp., *Saccharomyces*

15 *cerevisiae*, Prokaryonten, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis* oder Eukaryonten, wie Säugerzellen, Insektenzellen oder Pflanzenzellen zu nennen. Die Verfahren zur Klonierung sind dem Fachmann wohlbekannt (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual,

20 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Vorzugsweise sind *E. coli*-Stämme für diesen Zweck zu benutzen. Ganz besonders bevorzugt sind: *E. coli* XL1 Blue, NM 522, JM101, JM109, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10-, HB101, BL21 codon plus, BL21 (DE3) codon plus, BL21, BL21 (DE3), MM294. Plasmide, mit denen das die erfindungsgemäße Nukleinsäure aufweisende Genkonstrukt vorzugsweise in den Wirtsorganismus kloniert wird, sind dem Fachmann ebenfalls bekannt (s.a. PCT/EP03/07148; s.u.).

25 Als Plasmide bzw. Vektoren kommen im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck zur Verfügung stehenden Ausführungsformen in Frage. Derartige Plasmide und Vektoren können z. B. von Studier und Mitarbeiter (Studier, W. F.; Rosenberg A. H.; Dunn J. J.; Dubendorff J. W.; (1990), Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, Methods Enzymol. 185, 61-89) oder den Broschüren der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech oder

Gibco BRL entnommen werden. Weiter bevorzugte Plasmide und Vektoren können gefunden werden in: Glover, D. M. (1985), DNA cloning: a practical approach, Vol. I-III, IRL Press Ltd., Oxford; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds)

5 1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goeddel, D. V. (1990), Systems for heterologous gene expression, Methods Enzymol. 185, 3-7; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 10 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Plasmide, mit denen die die ins Auge gefassten Nukleinsäuresequenzen aufweisenden Genkonstrukte in ganz bevorzugter Weise in den Wirtsorganismus kloniert werden können, sind oder basieren auf: pUC18/19 (Roche 15 Biochemicals), pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac2 (Roche Biochemicals), pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech), pKK-233-3 (Stratagene) oder pET (Novagen).

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Ganzzellkatalysator vorzugsweise vor 20 dessen Einsatz so vorbehandelt, dass die Permeabilität der Zellmembran für die Substrate und Produkte gegenüber dem intakten System gesteigert ist. Besonders bevorzugt ist dabei ein Verfahren, bei dem der Ganzzellkatalysator beispielsweise durch Einfrieren und/oder Behandlung mit Toluol vorbehandelt wird. Die Grundzüge des 25 erfindungsgemäßen Verfahrens sind in Schema 2 dargestellt.

Es lassen sich mit dem gegenständlichen Verfahren wie im Stand der Technik für den Einsatz der einzelnen Enzyme auch beschrieben die Substrate in außerordentlich hoher 30 Konzentration einsetzen. Vorteilhaft ist hier der Einsatz der 2-Ketocarbonsäure in einer Konzentration von größer 500 mM. Weiter bevorzugt lässt sich das Substrat in Konzentrationen von größer 800 mM, bevorzugt größer 900 mM und ganz besonders bevorzugt von größer 1000 mM in die 35 Reaktion einsetzen. Bei dieser Ausführungsform ist jedoch

der Zusatz von Cofaktor zur Redaktionsmischung essenziell, um entsprechende Umsatzraten zu erreichen.

Will man allerdings trotz geforderter hoher Raumzeitausbeute den Ganzzellkatalysator dergestalt einsetzen, dass kein

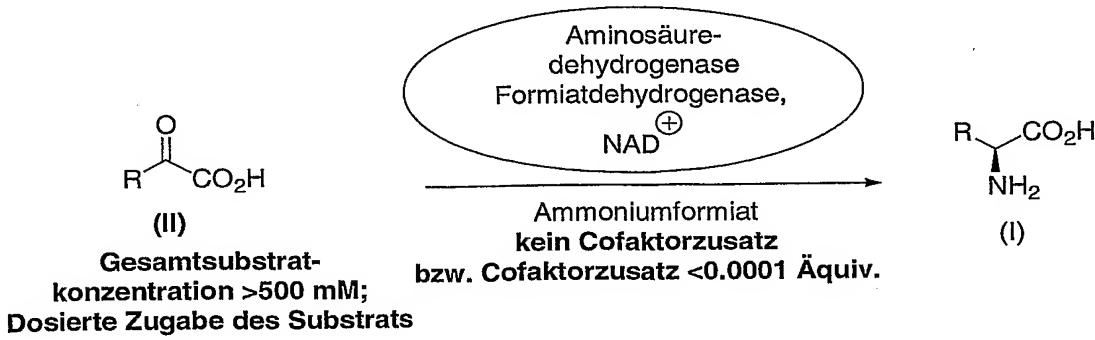
5 externaler Zusatz oder ein äußerst geringer externaler Zusatz von unter 0,0001 Äquivalenten des teuren Cofaktors notwendig wird, so kann der Fachmann dies überraschenderweise mit der erfindungsgemäßen Dosierung des Substrats erreichen.

Bei der gegenständlichen Reaktion geht man bevorzugt so vor, dass man den Ganzzellkatalysator und den Ammoniumionen-Donor

10 in Wasser vorlegt. Als Ammoniumionen-Donor kann jede dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommende Verbindung eingesetzt werden. Insbesondere sind dies Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus typischen

15 Ammoniumsalzen. Ganz besonders bevorzugt kommt Ammoniumformiat zum Einsatz, wenn eine Formiatdehydrogenase als Cofaktor-Regenerierungssystem gewählt wird. Die Reaktion lässt sich an folgendem Schema 2 sehr anschaulich darstellen.

Ganzzellkatalysator:



20 Dosierte Zugabe des Substrats

Schema 2. Reaktionsprinzip des erfindungsgemäßen Ganzzellkatalysatorverfahren (am Beispiel einer NAD⁺-abhängigen Aminosäuredehydrogenase und einer Formiatdehydrogenase zur Cofaktorregenerierung)

25 Werden statt der Leucin-dehydrogenase andere Dehydrogenasen eingesetzt, so können die Bedingungen unter denen das betreffende Enzym optimal funktioniert dem Stand der Technik

entnommen werden. Im Hinblick auf den Einsatz einer Phenylalanindehydrogenase wird auf die US5416019 und Galkin et al. (Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 4651) verwiesen.

Auf der Seite der Cofaktor-regenerierenden Enzyme und die 5 einzustellenden Bedingungen kann auf die EP1295937 (Formiatdehydrogenase), PCT/EP/03/08631 (Malatdehydrogenase) und auf Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Volume III, Wiley-VCH, Weinheim, 2002 (Glucosedehydrogenase) und dort zitierte Literatur verwiesen 10 werden.

Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren. Im Batch-Prozess kann die Biomasse durch Filtration oder Zentrifugation leicht vom Produkt abgetrennt werden. Die erhaltene Aminosäure kann 15 dann nach gängigen Verfahren isoliert werden (Ionenaustauschchromatografie, Kristallisation).

Das gegenständliche Verfahren kann jedoch auch kontinuierlich durchgeführt werden. Dazu wird die Reaktion in einem so genannten Enzym-Membran-Reaktor durchgeführt, in 20 dem hochmolekulare Stoffe - die Biomasse - hinter einer Ultrafiltrationmembran zurückgehalten werden und niedermolekulare Stoffe - wie die produzierten Aminosäuren - die Membran passieren können. Eine derartige Verfahrensweise wurde im Stand der Technik schon mehrfach beschrieben 25 (Wandrey et al. in Jahrbuch 1998, Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI, S. 151ff; Kragl et al., Angew. Chem. 1996, 6, 684).

Das hier vorgestellte Verfahren zur Herstellung von insbesondere sperrigen Aminosäuren kann auf Grund seiner 30 Vorteile sehr gut im kommerziellen Maßstab etabliert werden. Die überraschende Tatsache, dass der bei der ins Auge gefassten Reaktion notwendige Zusatz eines Cofaktors im erfindungsgemäßen Verfahren unterbleiben kann, sowie die Vorteile aus der leichten Handhabbarkeit der

Ganzzellkatalysatoren machen die nicht naheliegende Überlegenheit der vorliegenden Erfindung gegenüber den Verfahren des Standes der Technik aus.

Des weiteren kann als Überraschung gelten, dass der Einfluss unerwünschter stoffwechselphysiologischer Funktionen bei Einsatz des Ganzzellkatalysators keine Rolle spielt. Beides hilft in außerordentlich umfassender Art und Weise die Prozesskosten zur Herstellung der L- α -Aminosäuren zu senken.

Überraschend ist weiterhin, dass trotz Permeabilisierung der Zellwand und der damit verbundenen Möglichkeit eines Austretens des in den Zellen befindlichen Cofaktors eine zu erwartende negative Beeinträchtigung der Reaktion, beispielsweise durch Verminderung des Umsatzes, nicht beobachtet wird.

Unter optisch angereicherten (enantiomerenangereicherten, enantiomer angereicherten, enantiomerenreinen) Verbindungen wird im Rahmen der Erfindung das Vorliegen einer optischen Antipode im Gemisch mit der anderen in >50 mol-% verstanden.

Unter einem Ganzzellkatalysator wird ein Mikroorganismus verstanden, der klonierte Gene enthält, die für Enzyme kodieren, welche mindestens zwei konsekutive Transformationsschritte für eine organisch-chemische Verbindung katalysieren können. Diesbezüglich und im Hinblick auf die allgemeinen Herstellungsverfahren (Abstimmung der Enzymexpression im Hinblick auf die Umsetzungsrationen) wird auf die EP1216304 verwiesen.

Unter Alkyl wird erfindungsgemäß ein (C₁-C₁₈)-Alkyl-Rest verstanden. Dieser umfasst lineare und beliebig verzweigte derartige Reste. Insbesondere sind mitumfasst Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, 1-n-Butyl-, 2-n-Butyl, 1- oder 2- Isobutyl, 1- oder 2- sec-Butyl-, tert-Butyl-, etc. Die Reste können einfach oder mehrfach mit (C₁-C₈) -

Heteroalkylresten oder Resten wie OH, SH, Hal, NH₂ substituiert sein. Unter Heteroalkylresten wird insbesondere verstanden ein wie oben dargestellter Alkyl-Rest mit ein bis acht C-Atomen, der Heteroatome wie O, S, N in seiner Kette 5 enthält, oder über diese Heteroatome an das ins Auge gefasste Molekül gebunden ist.

Unter externer Zusatz an Cofaktor ist gemeint, dass diese Menge an Cofaktor künstlich zur Reaktionsmischung hinzugegeben wird. Sie ist additiv zu der Menge an Cofaktor 10 zu sehen, die schon inhärent durch den Ganzzellkatalysator in Reaktionsmischung eingetragen wird.

Es versteht sich von selbst, dass die zur Reaktion eingesetzte 2-Ketocarbonsäure in der Reaktionsmischung in dissoziierter Form vorliegt. Diese Form kann erhalten werden 15 entweder durch Einsatz der Ketocarbonsäure und einstellen eines entsprechenden pH-Wertes oder durch Zugabe der Salze der Ketocarbonsäuren. Beide Formen sind sinngemäß und erfindungsgemäß hier mitumfasst.

Der Terminus Gesamtsubstratkonzentration steht für die 20 Gesamteinsatzmenge an Substrat pro Reaktionsvolumen.

Abbildungen:

Abb. 1 - pAM3.25 (Seq. ID No. 9):

Konstruktion von pJOE4580.2

Das Plasmid pJOE4580.2 entstand aus dem publizierten Plasmid
5 pJOE3075 (T. Stumpp, B. Wilms und J. Altenbuchner (2000)
Biospektrum 1/2000: 33-36) indem das male Gen durch
Schneiden mit den Restriktionsendonuklease NdeI/HindIII
entfernt wurde und durch zwei Oligonucleotide ersetzt
wurden, die die NdeI und HindIII Schnittstellen wieder
10 komplementierten und dazu noch eine NheI, AatII und PstI
Schnittstelle trugen. In die NheI Schnittstelle wurde nach
Auffüllen mit Klenow Polymerase und dNTPs ein SmaI Fragment
eingefügt aus dem Plasmid pJOE773 (J. Altenbuchner, P.
15 Viell, I. Pelletier (1992) Positive selection vectors based
on palindromic DNA sequences. Methods Enzymol 216: 457-
466.), das das lacZalpha Gen aus E. coli trägt. E. coli
JM109 mit diesem Plasmid zeigt auf LB-platten mit X-Gal und
IPTG blaue Kolonien. Dieses Plasmid wurde pJOE4580.2
genannt. In dieses wurde die FDH-Sequenz (Seq. ID No. 7)
20 kloniert. Es wurde pAM3.25 genannt.

Abb. 2 - pAM5.22

Konstruktion von pJOE4580.2

Das Plasmid pJOE4580.2 entstand aus dem publizierten Plasmid
25 pJOE3075 (T. Stumpp, B. Wilms und J. Altenbuchner (2000)
Biospektrum 1/2000: 33-36) indem das male Gen durch
Schneiden mit den Restriktionsendonuklease NdeI/HindIII
entfernt wurde und durch zwei Oligonucleotide ersetzt
wurden, die die NdeI und HindIII Schnittstellen wieder
30 komplementierten und dazu noch eine NheI, AatII und PstI
Schnittstelle trugen. In die NheI Schnittstelle wurde nach
Auffüllen mit Klenow Polymerase und dNTPs ein SmaI Fragment

eingefügt aus dem Plasmid pJOE773 (J. Altenbuchner, P. viell, I. Pelletier (1992) Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. Methods Enzymol 216: 457-466.), das das lacZalpha Gen aus *E. coli* trägt. *E. coli* 5 JM109 mit diesem Plasmid zeigt auf LB-platten mit X-Gal und IPTG blaue Kolonien. Dieses Plasmid wurde pJOE4580.2 genannt. In dieses wurde die LeuDH-Sequenz (Seq. ID No 5) insertiert. Das neue Plasmid heißt pAM5.22.

10 Abb. 3 - pAM8.21

Konstruktion von pHWG640.12 (Seq. ID No. 11)

Das Plasmid pHWG640.12 ist bisher nicht publiziert, so dass die Konstruktion nachfolgend beschrieben wird. Die Konstruktion dieses Plasmids pHWG640.12 erfolgt ausgehend 15 vom publizierten Plasmid pAW229 in leicht nachvollziehbarer Weise. Das Plasmid pAW229 ist ein pACYC184 Derivat mit Rhamnosepromotor. Ausgehend von pAW229 (B. Wilms, A. Wiese, C. Syldatk, R. Mattes, J. Altenbuchner (2001) J. Biotechnol 86:19-30) wurde das hyuC-Gen mit NdeI/HindIII aus dem 20 Plasmid ausgeschnitten und durch ein PCR Fragment ersetzt, das mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten war und das das sfcA Gen (malic enzyme) von *E. coli* K12 enthält. Das so entstandene Plasmid wurde als pHWG640.12 bezeichnet. In dieses wurde die LeuDH-Sequenz insertiert. Das neue Plasmid 25 heißt pAM8.21.

Abb. 4 - pAM10.1 (Seq. ID No. 10)

Im Plasmid pAM8.21 wurde das sfcA-Gen (Seq. ID No 11) deletiert. Das neue Plasmid heißt pAM10.1

Abb. 5

Biokatalysators mit Darstellung des Verlaufs der spezifischen Aktivität an Leucindehydogenase (LeuDH) und Formiatdehydogenase (FDH) sowie der optischen Dichte in 5 Abhängigkeit von der Induktionszeit; Zur Beschreibung der Fermentationsbedingungen im Detail, siehe Experimenteller Teil.

Experimentelle Beispiele

Herstellung des Ganzzellkatalysators

Genamplifikation und Klonierung

Zur Klonierung der Formiatdehydrogenase (FDH, *fdh3* aus 5 *Candida boidinii*, Mutante mit geringerer Oxidationsempfindlichkeit) und Leucindehydrogenase (LeuDH aus *Bacillus cereus*) für die Ganzzellkatalyse der Umsetzung von Trimethylpyruvat zu tert-Leucin mit Cofaktorregenerierung wurden die Gene beider Enzyme zunächst mit PCR aus chromosomaler DNA der oben genannten Stämme 0 amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgelistet, die Zusammensetzung der PCR-Ansätze in Tabelle 2 und das PCR-Programm in Tabelle 3.

Tabelle 1: Oligonucleotide für die Genamplifikation von FDH

15 und LeuDH

Oligo-nucleotid	Sequenz 5' - 3'		Seq. ID No.
s3713	AAA AAA <u>CTT AAG</u> AAG GAG ATA TAC ATA TGA CAT TAG AAA TCT TCG AA	LeuDH forward	1
s3714	AAA AAA <u>CTG CAG</u> TTA GCG ACG GCT AAT AAT AT	LeuDH reverse	2
s3723	AAA AAA <u>CAT ATG</u> AAG ATT GTC TTA GTT CTT	FDH forward	3
s3716	AAA AAA <u>GAC GTC</u> TTA TTT CTT ATC GTG TTT ACC	FDH reverse	4

Mit den Oligonucleotiden wurden den Genen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angehängt. Diese sind für s3713 -

BfrI, für s3714 - PstI, für s3723 - NdeI und s3716 - AatII
 (siehe unterstrichene Bereiche).

5 Tabelle 2: PCR-Ansätze, Polymerase, Puffer und MgCl₂ stammen
 von der Firma Biomaster, die DNA-Ausgangskonzentration der
 Plasmid-DNA betrug 50µg/ml

Komponente	für FDH	Ansatz für FDH	für LeuDH	Ansatz für LeuDH
Plasmid-DNA aus Stamm FDH-C235/C262A		2µl	Plasmid-DNA pLeu2	2µl
10x Puffer		10µl		10µl
50mM MgCl ₂		3µl		3µl
100% DMSO		10µl		10µl
10mM dNTPs		2µl		2µl
33mM Oligo 1	s3723	1µl	s3713	1µl
33mM Oligo2	s3716	1µl	s3714	1µl
Taq-Polymerase		1µl		1µl
VE H ₂ O		70µl		70µl

Tabelle 3: PCR-Programm: die Schritte 2 bis 4 wurden 30mal wiederholt

Schritt	T, t für FDH-Amplifikation	T, t für LeuDH-Amplifikation
1. Denaturierung der DNA	94°C, 5min	94°C, 5min
2. Oligo-Annealing	50°C, 1min	51°C, 1min
3. DNA-Elongation	72°C, 1:30min	72°C, 1:30min
4. Denaturierung der dsDNA	92°C, 1min	92°C, 1min
5. DNA-Elongation	72°C, 7min	72°C, 7min

Nach der Genamplifikation wurden die PCR-Fragmente mit den

5 „DNA PCR and Gelband Purification Kit“ der Firma GFX aufgereinigt und in die L-Rhamnose-induzierbaren Vektoren pJOE4580.2 (pBR322-Derivat; Abb. 1) bzw. pHWG640.12 (pACYC184-Derivat; Abb. 3; Seq. ID No. 11) mit Hilfe der unten genannten Restriktionsendonukleasen ligiert.

10 Restriktionsansätze wurden im allgemeinen mit circa 50µg/ml DNA im 10µl Standardansatz gemacht. Zugegeben wurde weiterhin 1µl des ersten Enzyms sowie 1µl des 10x konzentrierten Enzympuffers. Die Ansätze wurden mit VE H2O auf das Endvolumen eingestellt. Die zu inserierende DNA 15 wurde getrennt von der Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen inkubiert. Nach der Restriktion mit dem ersten Enzym erfolgte ein Fällungsschritt, in dem die DNA mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 8µl TE 10.01 aufgenommen wurde. Zu diesen 20 Ansätzen wurde jeweils 1µl des zweiten Enzyms und 1µl des zweiten 10x Enzympuffers gegeben und diese Ansätze erneut 1,5h bei 37°C inkubiert. Bei der Herstellung des Vektors

pAM10.1 aus pAM8.21 folgte zudem eine Behandlung mit Klenow-Polymerase. Dann wurde die DNA durch ein 1%iges Agarose-Gel (Seakem-Agarose mit 0,4 μ g/ml Ethidiumbromid) in ihre

Fragmente aufgetrennt und die richtigen Banden mit einem

5 Skalpell für die Weiterverwendung ausgeschnitten. Die DNA wurde aus den Gelblöckchen mit dem „EASY PURE Gel Purification Kit“ der Firma Biozym nach Anleitung eluiert und in 15 μ l TE 10.01 aufgenommen.

Für die Ligation von Vektor und Insert wurden die Ansätze so gewählt, dass die Insert-DNA etwa die doppelte Konzentration des Zielvektors erreichte. Auch hier betrug die DNA-

10 Konzentration circa 50 μ g/ml. Endvolumen für die Ligationsansätze war 10 μ l, die neben dem Vektor-Insert-

Gemisch auch 1 μ l Ligase und 1 μ l 10x konzentrierten

15 Ligasepuffer (beides von ROCHE) enthielten. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Ligationsansätze wurden in E. coli K12 JM109 transformiert, auf LB-Agar mit Antibiotika (100 μ g/ml Ampicillin (pAM3.25 [Seq. ID No. 9], pAM5.22) oder 25 μ g/ml Chloramphenicol (pAM8.21, pAM10.1 [Seq. ID No. 10]))

20 selektiert und Klone nach Plasmidisolierung auf das zu erwartende Plasmid kontrolliert.

Da zu Anfang LeuDH (Seq. ID No. 6) mit Malic Enzyme (Seq. ID No. 12) gekoppelt werden sollte, wurde das LeuDH Gen zuerst in pJOE4625.1 inseriert, das bereits das Gen für Malic

25 Enzyme (sfcA) enthielt (Abb. 2). Anschliessend wurde das LeuDH Gen in pHGW640.12 (Abb. 3) inseriert, einem pACYC184 Derivat, ebenfalls mit Rhamnosepromotor und sfcA Gen, das dann deletiert wurde. Die Umlonierung des LeuDH-Gens vom Plasmid pAM5.22 (Abb. 2) auf das Zielplasmid pAM10.1 (Abb. 30 4) war notwendig zur Erstellung eines Zweiplasmidsystems, dass zur Selektion zwei Resistenzmarker benötigt.

Tabelle 4: Klonierungsergebnisse

Gen/ Vektor	kloniert in Plasmid	Restriktion mit	neue Bezeichnung	Abb.
PCR-Fragment FDH	pJOE4580.2	NdeI, AatII	pAM3.25	1
PCR-Fragment LeuDH	pJOE4625.1	BfrI, PstI	pAM5.22	2
LeuDH aus pAM5.22	pHWG640.12	BfrI, BamHI	pAM8.21	3
pAM8.21	Ohne scfA-Gen	MunI, PstI	pAM10.1	4

Fermentation des Ganzzellkatalysators

Nachdem die Kombination FDH/LeuDH (*E. coli* 5 JM109/pAM3.25/pAM10.1) bei Versuchen im Miniaturmaßstab (1ml) im Thermoschüttler durch HPLC-Analyse die besseren Umsatzergebnisse von Trimethylpyruvat zu tert-Leucin als ein Vergleichsmodellsystem (Malic Enzyme/LeuDH auf pAM5.22) erreichte, wurden die Plasmide pAM3.25 und pAM10.1 in *E. coli* BW3110 transformiert, da dieser für Fermentationen geeigneter ist. Durch die Hochzelldichtefermentation sollte eine genügend große Biomasse für alle folgenden Untersuchungen mit dem Modellsystem hergestellt werden. Die Fermentation erfolgte ohne Antibiotikum, die Vorkulturen 10 wurden mit Antibiotikum angezogen, in einem 30l-Fermentor mit 8l Endvolumen bei 30°C. Die Zellen wurden dazu zunächst als Batchkultur bei 30°C angezogen bis zu einer OD₆₀₀=50 und einem vollständigen Verbrauch der Glucose (ca. 22h). dann 15 erfolgte die Genexpressionsinduktion durch Zugabe von sterilfiltrierter Rhamnose mit einer Endkonzentration von 0,2% sowie der Start als Fedbatchkultur durch automatische 20

Zugabe von Nährlösung und Mineralien (Feed I und Feed II). Ab der Induktion wurden alle zwei Stunden Proben genommen, von denen die OD und die Enzymaktivitäten mit den jeweiligen Aktivitätstests bestimmt wurden. In der Abbildung 5 sind der 5 Verlauf der OD sowie der Aktivitäten bis zum Fermentationsabbruch gegen die Zeit aufgetragen.

Die Fermentation wurde 22h nach der Rhamnoseinduktion abgebrochen, da die Aktivität der FDH trotz zunehmender Zelldichte stagniert war und die Ursache dafür vermutlich 10 ein Plasmidverlust oder zu saures Reaktionsmilieu war. Letzteres machte sich bemerkbar bei den Ganzzellumsetzungen, bei denen der pH-Wert im Vergleich zu einer vorher pH-regulierten Lösung bei Zugabe der Biofeuchtmasse deutlich 15 absank ($\Delta \text{pH}_{\text{max}}=0,8$). Die Aktivitäten der beiden Enzyme erreichten 0,565U/mg Gesamtprotein für die LeuDH und 0,123U/mg Gesamtprotein für die FDH. Die Volumenaktivitäten bezogen auf das Fermentationsmedium ergaben für die LeuDH 20 32,77U/ml und 7,14U/ml für die FDH. Die Zellausbeute nach dem Entfernen des Mediums in einem Separator ergab 1,4kg Biofeuchtmasse. Die Zellen wurden bei -20°C bis zum Einsatz als Ganzzellkatalysator zwischengelagert.

Fermentationsmedien

Vorkultur: 2x200ml

25 Vorkulturmödium: $c\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O} = 2\text{g/l}$
 $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 2,675\text{g/l}$
 $c\text{NH}_4\text{Cl} = 0,5\text{g/l}$
 $c\text{K}_2\text{HPO}_4 = 14,625\text{g/l}$
 $c\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} = 3,6\text{g/l}$

30 Autoklavieren in 90vol% H₂O

cGlucose=10g/l Endkonzentration
(Stocklösung, in H₂O)

Getrennt autoklavieren

1M MgSO₄-Lösung 2ml/l

5 TES 3ml/l

Thiamin-Stammlösung (10g/l in H₂O) 1ml/l

Batchkultur: Inokulum (380ml mit C_x=12g/l) mit Glucose, MgSO₄, TES und Thiamin in einem Animpfkolben zum autoklavierten Batchmedium zugeben

10 Batchmedium (Einwaage für 8l):

	Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	16g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	21,4g
	NH ₄ Cl	4g
	K ₂ HPO ₄	117g
15	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	28,8g
	(NH ₄) ₂ H-Citrat	8g
	in 7,5l H ₂ O lösen und im 30l-Fermenter sterilisieren	
	Glucose-Monohydrat	220g
20	in 500ml H ₂ O lösen und autoklavieren (25g/l)	
	1M MgSO ₄ -Lösung	16ml
	TES	24ml
	Thiamin-Lösung (10g/l)	8ml
	(Thiamin sterilfiltrieren, Rest autoklavieren)	
25	pH-Wert 7,2 mit H ₃ PO ₄ und NH ₃	

Fedbatch-Feed:

I. Glucose-Monohydrat 2750g in 3,5l H₂O

autoklavieren

30 MgSO₄·7H₂O 98,5g in 0,15l H₂O

autoklavieren

TES-Lösung 0,5l

autoklavieren

Thiamin 2,5g in 0,05l H₂O

sterilfiltrieren

anschließend vereinigen in einem Zulaufkolben

5 II. (NH₄)₂HPO₄ 396g in 1l H₂O, pH7
autoklavierenFeed I und II werden mittels zwei getrennten Pumpen
zugegeben20 pH-Wert: 7.2 (titriert mit H₃PO₄ und NH₃)pO₂: ca. 50kPa (reguliert durch Rührerdrehzahl)Spurenelemente-Lösung (TES): CaCl₂·2H₂O 0,5gZnSO₄·7H₂O 0,18g15 MnSO₄·H₂O 0,1g

Di-Na-EDTA 20,1g

FeCl₃·6H₂O 16,7gCuSO₄·5H₂O 0,16gCoCl₂·6H₂O 0,18g20 H₂O ad 1l

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei 900 mM ohne Dosierung (Vergleichsbeispiel = Synthesebeispiel 1)

Es werden zu 5.85 g des Biokatalysators (Biomasse *E. coli* 5 JM105(pAM 3.25_10.1)) und 7.95 g Ammoniumformiat (2.8 mol-Äquivalente) 50 mL einer 0.9 M Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 10 32%-igem Ammoniak), die zugleich 1 mM Magnesiumchlorid und 1% (v/v) Toluol enthält, gegeben. Der pH-Wert wird zu Beginn der Reaktion auf pH 7.0 nachgestellt und danach nicht weiter reguliert, so dass der pH-Wert während der Reaktion ansteigt. Die Reaktionstemperatur beträgt 30 °C. Nach 8 h Reaktionszeit wird ein Umsatz von 24.6% gemessen, der auch nach weiteren 15 h Rühren nicht mehr gesteigert werden kann.

15

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei ca. 0,9 M mit Fedbatch-Dosierung (Synthesebeispiel 2)

Es werden zunächst in einem 250L-Dreihalskolben 23,84 g Ammoniumformiat (entsprechend 2.8 Äquivalenten bezogen auf 20 die gesamte eingesetzte Substratmenge) und 17.55 g des Biokatalysators (Biomasse *E. coli* JM105(pAM 3.25_10.1)) eingewogen und dazu 28.50 mL VE-Wasser sowie 150 µL einer 1M Magnesiumchloridlösung (entsprechend einer 1 mM Konzentration bezogen auf das Endvolumen) hinzugefügt. Bei 25 Erreichen der Reaktionstemperatur von 30 °C wird durch Zugabe von 7,50 mL einer 1.8 M Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 30 32%-igem Ammoniak) die Reaktion gestartet. Der pH-Wert wird anschließend durch Zugabe von 32%-igem Ammoniak auf pH 7.0 gestellt. Anschließend werden nach in definierten Zeitabständen zunächst zweimal jeweils 7.50 mL einer 1.8 M Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 32%-igem Ammoniak), sowie anschließend fünfmal unterschiedliche Volumina einer 1.8 M

Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt mit 32%-igem Ammoniak) zudosiert. Die Zeitabstände sowie die jeweils zudosierten Mengen sind in nachfolgender Dosiertabelle angegeben. Das Endvolumen beträgt 150 mL und die Gesamtkonzentration an eingesetztem Substrat beträgt 0.86 M, entsprechend einer volumetrischen Menge an Trimethylbrenztraubensäure von 112.5 g/L. Nach 24 h Reaktionszeit wird ein vollständiger Umsatz (>98% gemäß HPLC) beobachtet.

10

Dosiertabelle	Substratlsg.	Substratlsg.
Zeit (h)	ml (1,8M)	ml (0,9M)
0	7,5	0
0,5	7,5	0
1	7,5	0
2,5	0	15
4	0	17,5
5,5	0	20
6,5	0	22,5
7	0	24
Gesamtvolumen an zudosierter Substratlösung	22,5	99

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei 1 M mit kontinuierlicher Dosierung (Synthesebeispiel 3)

Es werden zunächst in einem 250L-Dreihalskolben 26.48 g Ammoniumformiat (entsprechend 2.8 Äquivalenten bezogen auf 5 die gesamte eingesetzte Substratmenge), 150 μ L einer 1M Magnesiumchloridlösung (entsprechend einer 1 mM Konzentration bezogen auf das Endvolumen) und 19.49 g des Biokatalysators (Biomasse E. coli JM105 (pAM 3.25_10.1) eingewogen und dazu 30 mL VE-Wasser hinzugefügt. Der pH-Wert 10 wird anschließend durch Zugabe von 32%-igem Ammoniak auf pH 7.0 gestellt. Bei Erreichen der Reaktionstemperatur von 30 °C gibt man kontinuierlich mit einem Flow von 0.2 mL/min über einen Zeitraum von 10 Stunden insgesamt 120 mL einer 1.25 M Trimethylbrenztraubensäurelösung (pH 7.0, eingestellt 15 mit 32%-igem Ammoniak) zu. Das Endvolumen beträgt 150 mL und die Gesamtkonzentration an eingesetztem Substrat beträgt 1.0 M, entsprechend einer volumetrischen Menge an Trimethylbrenztraubensäure von 130.1 g/L. Nach 27 h 20 Reaktionszeit wird ein Umsatz von 96% (gemäß HPLC) beobachtet.

Herstellung von L-tert-Leucin mit einem Ganzzellkatalysator bei 700 mM mit Fedbatch-Dosierung

In ein konisch geformtes 100ml Reaktionsgefäß eines STAT 25 Titrino 718 werden zuerst 2,55g Natriumformiat (entspricht 2,5mol/l bezüglich Endvolumen) gegeben, 15 μ l einer 1M MgCl₂-Lösung (entspricht 1mM Endkonzentration) zugesetzt und 4,5ml einer 1M TMP-Lösung (pH7 mit 25%igem Ammoniak eingestellt) sowie 1,5vol% Toluol (bezüglich Endvolumen) zugegeben. Das 30 Volumen wird mit VE H₂O auf 15ml aufgefüllt. Die Reaktionstemperatur von 30°C wird durch einen Wasserkreislauf stabil gehalten und kontrolliert. Vom Biokatalysator wurde 1g Biofeuchtmasse im Substratgemisch

resuspendiert und der pH-Wert mit 25%igem Ammoniak auf pH6,9 bis pH7 eingestellt.

Nach Erreichen von pH7,5 werden wiederholt 4,5ml der 1M TMP-Lösung (pH7) zugegeben. Der pH-Wert sinkt dabei um ca.

5 $\Delta\text{pH}=0,3$. Sobald pH7,5 erreicht wird, erfolgt erneut die Zugabe von 4,5ml 1M TMP-Lösung. Die Zugabe von TMP im genannten Volumen wird 10x wiederholt bis der pH-Wert sich bei der Zugabe von TMP nicht mehr nach unten verändert. Bei 10 der achten Zugabe von TMP erfolgt außerdem die Zugabe von 4ml 4M Natrium-Formiatlösung (entspricht ohne Berücksichtigung eines Umsatzes einer Konzentration von 973mM im Medium). Das Endvolumen beträgt 64ml mit einer volumetrischen Endkonzentration (ohne Berücksichtigung des Umsatzes) von Trimethylbrenztraubensäure von 774mM

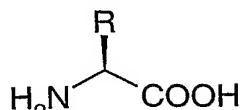
15 (100,6g/l). Natriumformiat liegt mit einer Endkonzentration von 836mM in der Lösung vor. Nach bereits 6h konnte durch HPLC ein Umsatz von Trimethylbrenztraubensäure von 92% beobachtet werden.

In der folgenden Tabelle 5 sind die Konzentrationen beider Substrate zu den verschiedenen Zugabepunkten aufgelistet.

Zeitpunkt [t in min]	Konzentration Trimethylbrenz- traubensäure [mM]	Konzentration Natriumformiat [mM]	zweite Natriumformiat -zugabe
0	300	2500	
45	461,54	1923,08	
60	562,5	1562,5	
75	631,58	1315,79	
90	681,82	1136,36	
105	720	1000	
120	750	892,86	
135	774,19	806,45	
150	736,36	972,73	x
180	756,30	899,16	
210	773,44	835,94	

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten L- α -Aminosäuren oder deren Salzen durch Umsetzen der entsprechenden 2-Ketocarbonsäure mit einem Ammoniumionen-Donor in Gegenwart eines Ganzzellkatalysators aufweisend ein kloniertes Gen kodierend für eine Cofaktor-abhängige Aminosäuredehydrogenase und ein kloniertes Gen kodierend für ein den Cofaktor regenerierendes Enzym bei einer Gesamteinsatzmenge an Substrat pro Reaktionsvolumen von ≥ 500 mM, wobei die Zugabe des Substrats so dosiert wird, dass die stationäre Konzentration an 2-Ketocarbonsäure unter 500 mM liegt und die externe Zugabe an Cofaktor bezogen auf die Gesamteinsatzmenge an Substrat $< 0,0001$ Äquivalente entspricht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man keinen Cofaktor zur Reaktionsmischung zusetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man solche 2-Ketocarbonsäuren einsetzt, die Aminosäuren der allgemeinen Formel (I)



(I)

worin R für Alkyl, insbesondere eine raumerfüllende, verzweigte, ein tertiäres C-Atom aufweisende Alkylgruppe mit 5-10 C-Atomen, beispielsweise tert-Butyl, und substituierte Alkyl steht, liefern.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass
die Zudosierung des Substrats nach einem Fedbatch-
verfahren erfolgt.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden

5 Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass
man die 2-Ketocarbonsäure in einer maximalen
stationären Konzentration von unter 450 mM, ganz
bevorzugt von unter 400 mM hält.

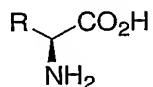
10 6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden

Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass
man den Ganzzellkatalysator vor dessen Einsatz so
vorbehandelt, dass die Permeabilität der Zellmembran
15 für die Substrat und Produkte gegenüber dem intakten
System gesteigert ist.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von insbesondere enantiomerenangereicherten L- α -Aminosäuren, insbesondere solche der allgemeinen Formel
5 (I).



(I)

Das erfindungsgemäße Verfahren geht dabei von 2-Ketocarbonsäuren aus, die durch einen Ganzzellkatalysator aufweisend eine Aminosäuredehydrogenase und ein Cofaktor-

10 regenerierendes Enzym zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden.

Abb. 1

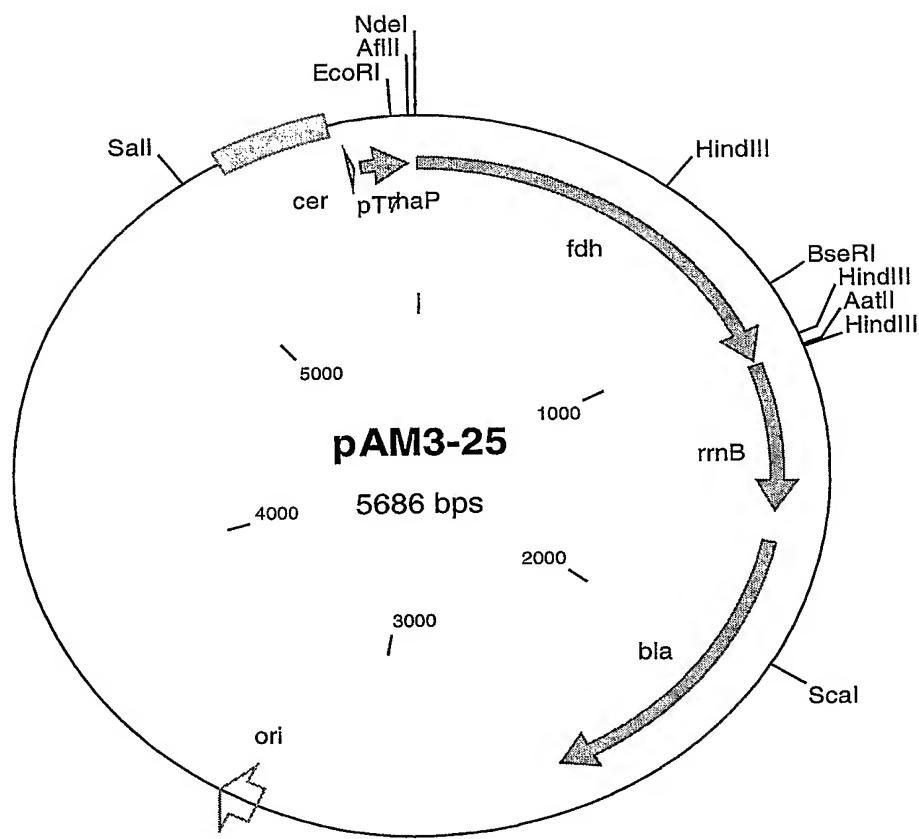


Abb. 2

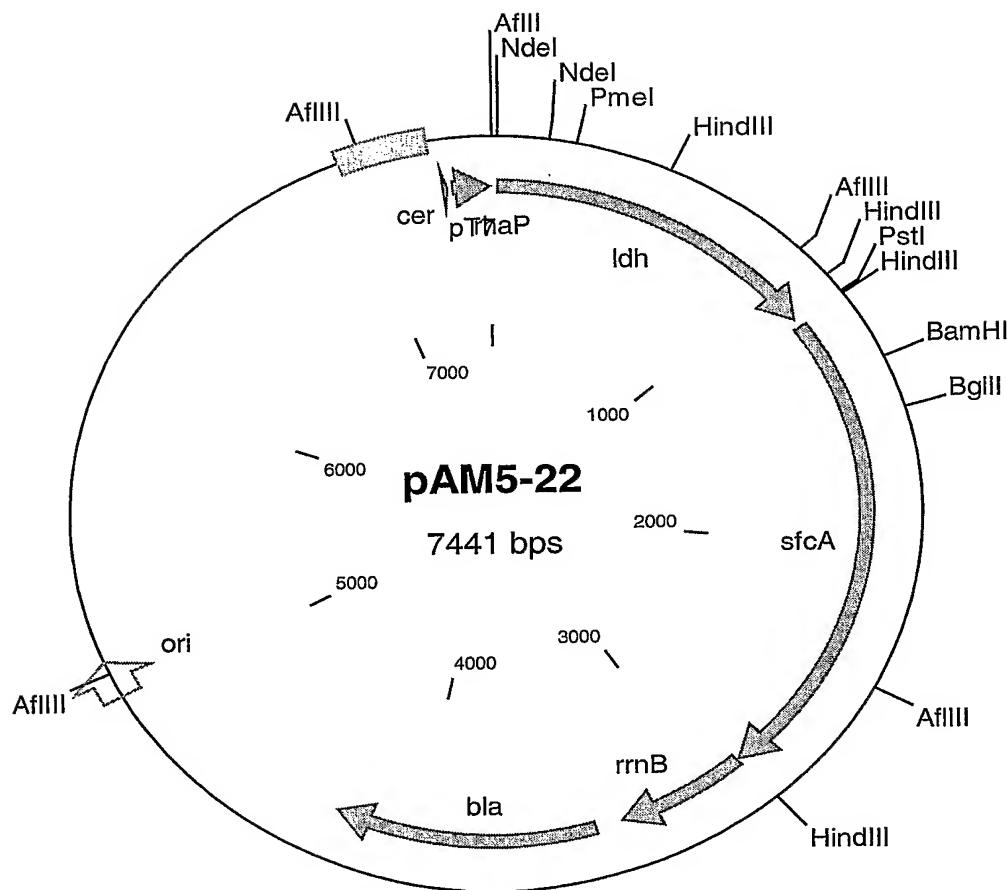


Abb. 3

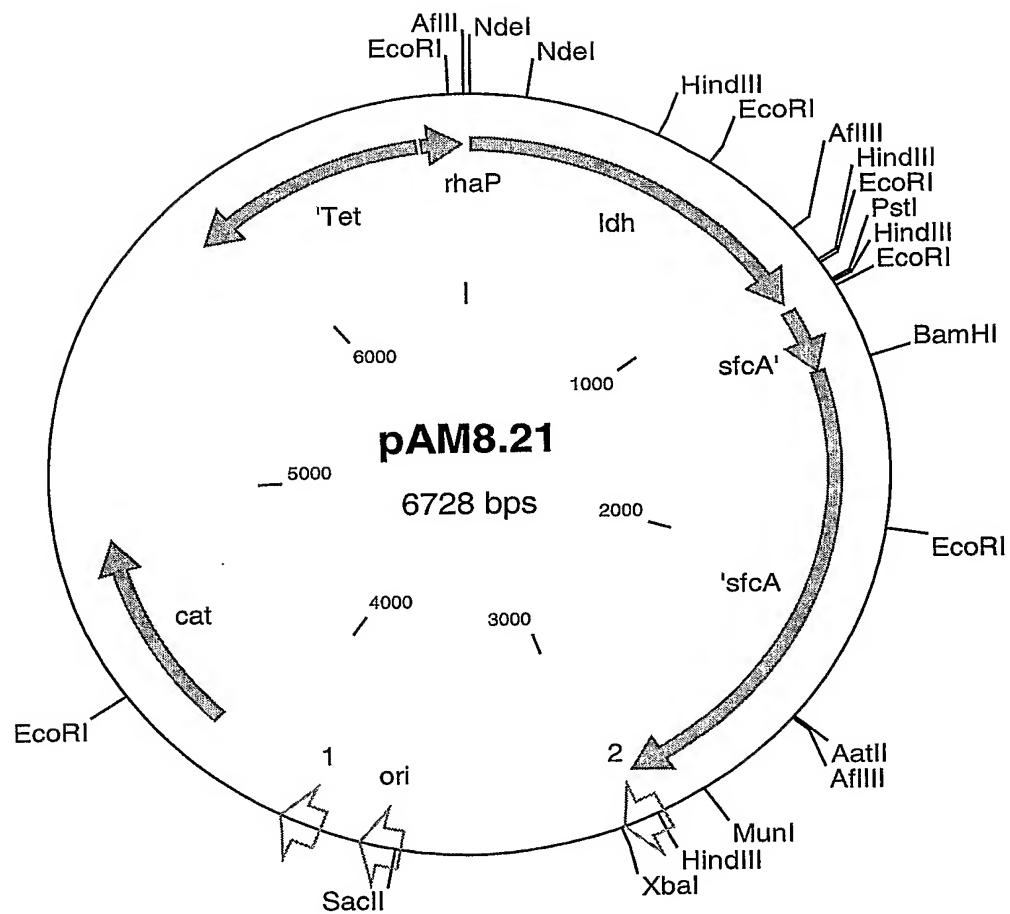


Abb. 4

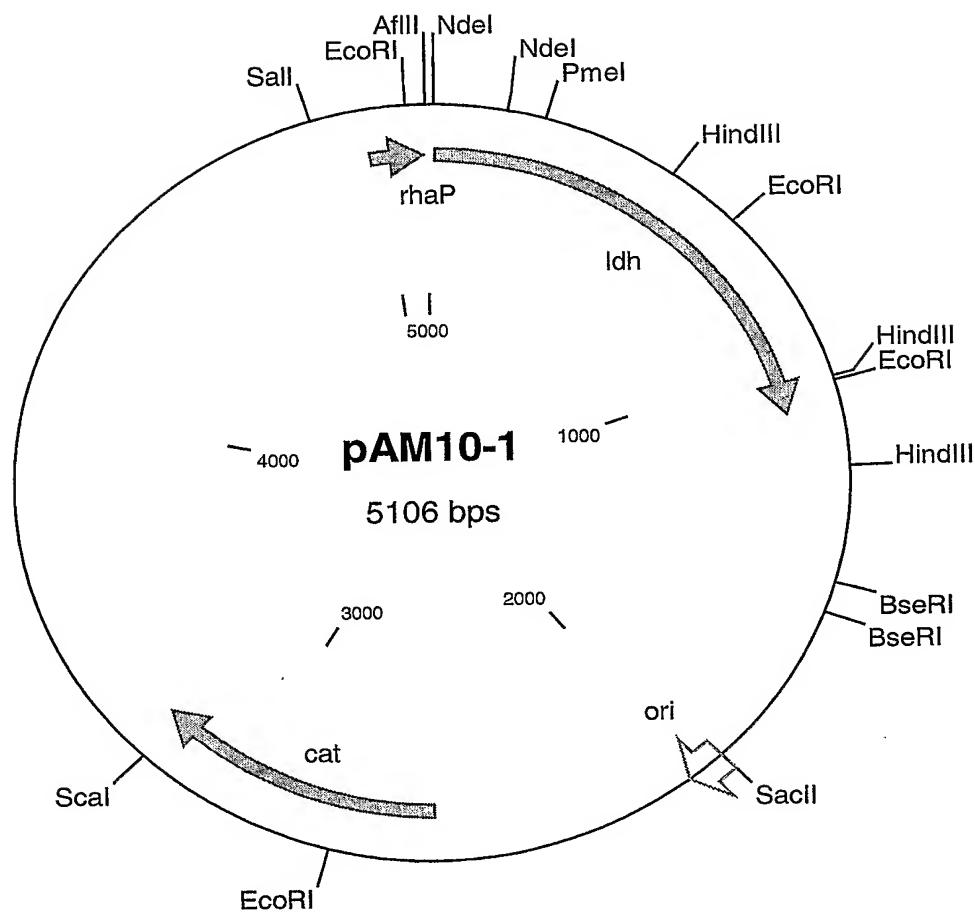
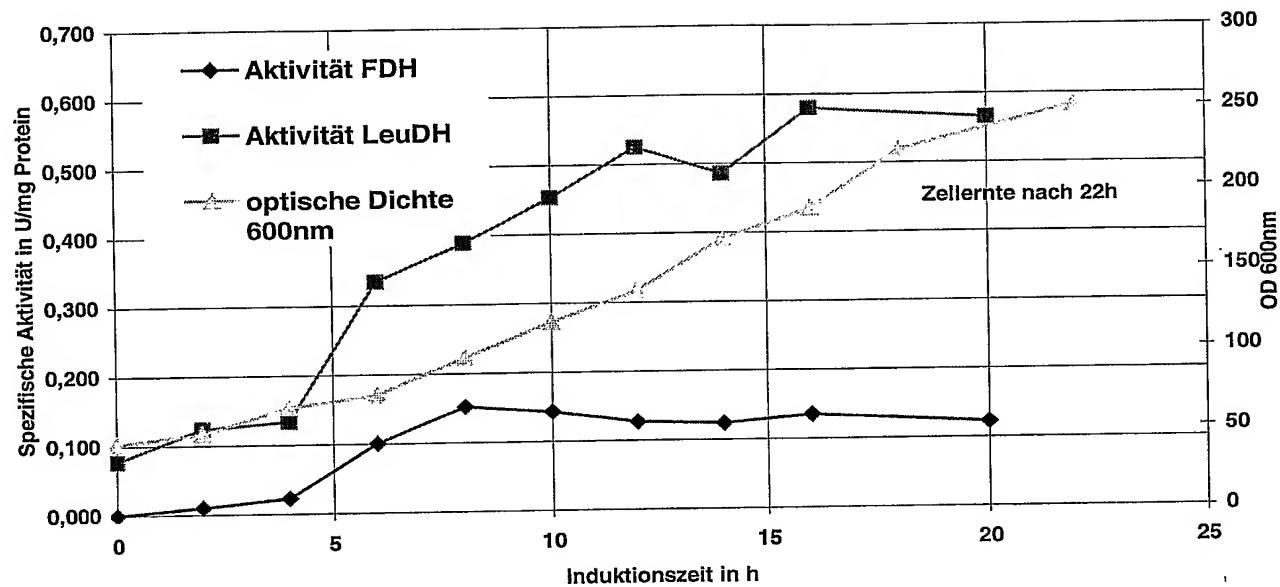


Abb. 5



SEQUENCE LISTING

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Aminosäuren mittels
eines Ganzzellkatalysators

<130> 040055 AM

10 <160> 12

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

0 <220>

<223> Primer

<400> 1

aaaaaaactta agaaggagat atacatatga cattagaaaat cttcgaa

47

25

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> Primer

<400> 2

32

35

aaaaaaactgc agttagcgac ggctaataat at

0 <210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

45

<400> 3

30

aaaaaaacata tgaagattgt cttagttctt

50

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

55

<220>

<223> Primer

<400> 4

32

aaaaaaagacg tcttatttct tatcgtgtt ac

5 <210> 5
 <211> 1120
 <212> DNA
 <213> *Bacillus cereus*
 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (20) .. (1120)
 <223>
 15 <400> 5
 ttaagaagga gatatacat atg aca tta gaa atc ttc gaa tac tta gaa aaa 52
 Met Thr Leu Glu Ile Phe Glu Tyr Leu Glu Lys
 1 5 10
 20 tat gat tat gag caa gta gta ttt tgt caa gat aaa gaa tct ggt tta 100
 Tyr Asp Tyr Glu Gln Val Val Phe Cys Gln Asp Lys Glu Ser Gly Leu
 15 20 25
 25 aaa gca att att gca att cat gat aca aca ctt gga ccg gct ctt ggt 148
 Lys Ala Ile Ile Ala Ile His Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly
 30 35 40
 30 gga aca aga atg tgg aca tat gat tct gaa gaa gcg gcg att gaa gat 196
 Gly Thr Arg Met Trp Thr Tyr Asp Ser Glu Glu Ala Ala Ile Glu Asp
 45 50 55
 35 gca ttg cgt ctt gca aaa ggg atg aca tac aaa aac gca gca gct ggt 244
 Ala Leu Arg Leu Ala Lys Gly Met Thr Tyr Lys Asn Ala Ala Gly
 60 65 70 75
 40 tta aac tta ggt ggt gcg aaa aca gta att atc ggt gat cct cgt aaa 292
 Leu Asn Leu Gly Gly Ala Lys Thr Val Ile Ile Gly Asp Pro Arg Lys
 50 80 85 90
 45 gat aag agc gaa gca atg ttc cgt gca cta gga cgt tat atc caa gga 340
 Asp Lys Ser Glu Ala Met Phe Arg Ala Leu Gly Arg Tyr Ile Gln Gly
 95 100 105
 50 cta aac gga cgt tac att aca gct gaa gat gtt ggt aca aca gta gat 388
 Leu Asn Gly Arg Tyr Ile Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Val Asp
 110 115 120
 55 gat atg gat att atc cat gaa gaa act gac ttt gta aca ggt atc tca 436
 Asp Met Asp Ile Ile His Glu Glu Thr Asp Phe Val Thr Gly Ile Ser
 125 130 135
 60 cca tca ttc ggt tct tct ggt aac cca tct ccg gta act gca tac ggt 484
 Pro Ser Phe Gly Ser Ser Gly Asn Pro Ser Pro Val Thr Ala Tyr Gly
 140 145 150 155
 65 gtt tac cgt ggt atg aaa gca gct gca aaa gaa gct ttc ggt act gac 532
 Val Tyr Arg Gly Met Lys Ala Ala Lys Glu Ala Phe Gly Thr Asp
 160 165 170
 70 aat tta gaa gga aaa gta att gct gtt caa ggc gtt ggt aac gta gca 580
 Asn Leu Glu Gly Lys Val Ile Ala Val Gln Gly Val Gly Asn Val Ala

	175	180	185	
5	tat cac cta tgc aaa cat tta cac gct gaa gga gca aaa tta att gtt Tyr His Leu Cys Lys His Leu His Ala Glu Gly Ala Lys Leu Ile Val 190 195 200			628
10	aca gat att aat aaa gaa gct gta caa cgt gct gta gaa gaa ttc ggt Thr Asp Ile Asn Lys Glu Ala Val Gln Arg Ala Val Glu Glu Phe Gly 205 210 215			676
15	gca tca gca gtt gaa cca aat gaa att tac ggt gtt gaa tgc gat att Ala Ser Ala Val Glu Pro Asn Glu Ile Tyr Gly Val Glu Cys Asp Ile 220 225 230 235			724
20	gca cca tgt gca cta ggc gca aca gtt aat gat gaa act att cca Tyr Ala Pro Cys Ala Leu Gly Ala Thr Val Asn Asp Glu Thr Ile Pro 240 245 250			772
25	caa ctt aaa gca aaa gta atc gca ggt tct gcg aat aac caa tta aaa Gln Leu Lys Ala Lys Val Ile Ala Gly Ser Ala Asn Asn Gln Leu Lys 255 260 265			820
30	gaa gat cgt cat ggt gac atc att cat gaa atg ggt att gta tac gca Glu Asp Arg His Gly Asp Ile Ile His Glu Met Gly Ile Val Tyr Ala 270 275 280			868
35	cca gat tat gta att aat gca ggt ggc gta att aac gta gca gac gaa Pro Asp Tyr Val Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Asn Val Ala Asp Glu 285 290 295			916
40	tta tat gga tac aat aga gaa cgt gca cta aaa cgt gtt gag tct att Leu Tyr Gly Tyr Asn Arg Glu Arg Ala Leu Lys Arg Val Glu Ser Ile 300 305 310 315			964
45	tat gac acg att gca aaa gta atc gaa att tca aaa cgc gat ggc ata Tyr Asp Thr Ile Ala Lys Val Ile Glu Ile Ser Lys Arg Asp Gly Ile 320 325 330			1012
50	gca act tat gta gcg gca gat cgt cta gct gaa gag cgc att gca agc Ala Thr Tyr Val Ala Ala Asp Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ile Ala Ser 335 340 345			1060
55	ttg aag aat tct cgt agc act tac tta cgc aac ggt cac gat att att Leu Lys Asn Ser Arg Ser Thr Tyr Leu Arg Asn Gly His Asp Ile Ile 350 355 360			1108
55	agc cgt cgc taa Ser Arg Arg 365			1120
55	<210> 6 <211> 366 <212> PRT <213> <i>Bacillus cereus</i>			
	<400> 6			

Met Thr Leu Glu Ile Phe Glu Tyr Leu Glu Lys Tyr Asp Tyr Glu Gln
1 5 10 15

5 Val Val Phe Cys Gln Asp Lys Glu Ser Gly Leu Lys Ala Ile Ile Ala
20 25 30

10 Ile His Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly Gly Thr Arg Met Trp
35 40 45

15 Thr Tyr Asp Ser Glu Glu Ala Ala Ile Glu Asp Ala Leu Arg Leu Ala
50 55 60

20 Lys Gly Met Thr Tyr Lys Asn Ala Ala Gly Leu Asn Leu Gly Gly
65 70 75 80

25 Ala Lys Thr Val Ile Ile Gly Asp Pro Arg Lys Asp Ser Glu Ala
85 90 95

30 Met Phe Arg Ala Leu Gly Arg Tyr Ile Gln Gly Leu Asn Gly Arg Tyr
100 105 110

35 Ile Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Val Asp Asp Met Asp Ile Ile
115 120 125

40 His Glu Glu Thr Asp Phe Val Thr Gly Ile Ser Pro Ser Phe Gly Ser
130 135 140

45 Ser Gly Asn Pro Ser Pro Val Thr Ala Tyr Gly Val Tyr Arg Gly Met
145 150 155 160

50 Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Phe Gly Thr Asp Asn Leu Glu Gly Lys
165 170 175

55 Val Ile Ala Val Gln Gly Val Gly Asn Val Ala Tyr His Leu Cys Lys
180 185 190

60 His Leu His Ala Glu Gly Ala Lys Leu Ile Val Thr Asp Ile Asn Lys
195 200 205

65 Glu Ala Val Gln Arg Ala Val Glu Glu Phe Gly Ala Ser Ala Val Glu
210 215 220

70 Pro Asn Glu Ile Tyr Gly Val Glu Cys Asp Ile Tyr Ala Pro Cys Ala
225 230 235 240

Leu Gly Ala Thr Val Asn Asp Glu Thr Ile Pro Gln Leu Lys Ala Lys
 245 250 255

5 Val Ile Ala Gly Ser Ala Asn Asn Gln Leu Lys Glu Asp Arg His Gly
 260 265 270

10 Asp Ile Ile His Glu Met Gly Ile Val Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Ile
 275 280 285

15 Asn Ala Gly Gly Val Ile Asn Val Ala Asp Glu Leu Tyr Gly Tyr Asn
 290 295 300

20 Arg Glu Arg Ala Leu Lys Arg Val Glu Ser Ile Tyr Asp Thr Ile Ala
 305 310 315 320

25 Lys Val Ile Glu Ile Ser Lys Arg Asp Gly Ile Ala Thr Tyr Val Ala
 Ala Asp Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ile Ala Ser Leu Lys Asn Ser Arg
 340 345 350

30 Ser Thr Tyr Leu Arg Asn Gly His Asp Ile Ile Ser Arg Arg
 355 360 365

35 <210> 7
 <211> 1095
 <212> DNA
 <213> Candida boidinii

40 <220>
 45 <221> CDS
 <222> (1)..(1095)
 <223>

45 atg aag att gtc tta gtt ctt tat gat gct ggt aag cac gct gat 48
 Met Lys Ile Val Leu Val Leu Tyr Asp Ala Gly Lys His Ala Ala Asp
 1 5 10 15

50 gaa gaa aaa tta tat ggt tct act gaa aat aaa tta ggt att gct aat 96
 Glu Glu Lys Leu Tyr Gly Ser Thr Glu Asn Lys Leu Gly Ile Ala Asn
 20 25 30

55 tgg tta aaa gat caa ggt cat gaa cta att act act tct gat aaa gaa 144
 Trp Leu Lys Asp Gln Gly His Glu Leu Ile Thr Ser Asp Lys Glu
 35 40 45

60 ggt gaa aca agt gaa ttg gat aaa cat atc cca gat gct gat att atc 192
 Gly Glu Thr Ser Glu Leu Asp Lys His Ile Pro Asp Ala Asp Ile Ile
 50 55 60

	atc acc act cct ttc cat cct gct tat atc act aag gaa aga ctt gac Ile Thr Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Ile Thr Lys Glu Arg Leu Asp 65 70 75 80	240
5	aag gct aag aac tta aaa tta gtc gtt gtc gct ggt gtt ggt tct gat Lys Ala Lys Asn Leu Lys Leu Val Val Val Ala Gly Val Gly Ser Asp 85 90 95	288
10	cac att gat tta gat tat att aat caa aca ggt aag aaa atc tca gtc His Ile Asp Leu Asp Tyr Ile Asn Gln Thr Gly Lys Ile Ser Val 100 105 110	336
15	ctg gaa gtt aca ggt tct aat gtt gtc tct gtt gct gaa cac gtt gtc Leu Glu Val Thr Gly Ser Asn Val Val Ser Val Ala Glu His Val Val 115 120 125	384
20	atg acc atg ctt gtc ttg gtt aga aat ttc gtt cca gca cat gaa caa Met Thr Met Leu Val Leu Val Arg Asn Phe Val Pro Ala His Glu Gln 130 135 140	432
25	att att aac cac gat tgg gag gtt gct gct atc gct aag gat gct tac Ile Ile Asn His Asp Trp Glu Val Ala Ala Ile Ala Lys Asp Ala Tyr 145 150 155 160	480
30	gat atc gaa ggt aaa act atc gct acc att ggt gct ggt aga att ggt Asp Ile Glu Gly Lys Thr Ile Ala Thr Ile Gly Ala Gly Arg Ile Gly 165 170 175	528
35	tac aga gtc ttg gaa aga tta ctc cca ttt aat cca aaa gaa tta tta Tyr Arg Val Leu Glu Arg Leu Leu Pro Phe Asn Pro Lys Glu Leu Leu 180 185 190	576
40	tac tac gat tat caa gct tta cca aaa gaa gct gaa gaa aaa gtt ggt Tyr Tyr Asp Tyr Gln Ala Leu Pro Lys Glu Ala Glu Glu Lys Val Gly 195 200 205	624
45	gct aga aga gtt gaa aat att gaa gaa tta gtt gct caa gct gat atc Ala Arg Arg Val Glu Asn Ile Glu Glu Leu Val Ala Gln Ala Asp Ile 210 215 220	672
50	gtt aca gtt aat gct cca tta cac gca ggt aca aaa ggt tta att aat Val Thr Val Asn Ala Pro Leu His Ala Gly Thr Lys Gly Leu Ile Asn 225 230 235 240	720
55	aag gaa tta tta tct aaa ttt aaa aaa ggt gct tgg tta gtc aat acc Lys Glu Leu Leu Ser Lys Phe Lys Lys Gly Ala Trp Leu Val Asn Thr 245 250 255	768
50	gca aga ggt gct att gct gtt gct gaa gat gtt gca gca gct tta gaa Ala Arg Gly Ala Ile Ala Val Ala Glu Asp Val Ala Ala Leu Glu 260 265 270	816
55	tct ggt caa tta aga ggt tac ggt ggt gat gtt tgg ttc cca caa cca Ser Gly Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro 275 280 285	864

gct cca aag gat cac cca tgg aga gat atg aga aat aaa tat ggt gct	912
Ala Pro Lys Asp His Pro Trp Arg Asp Met Arg Asn Lys Tyr Gly Ala	
290 295 300	
5 ggt aat gcc atg act cct cac tac tct ggt act act tta gac gct caa	960
Gly Asn Ala Met Thr Pro His Tyr Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ala Gln	
305 310 315 320	
10 aca aga tac gct gaa ggt act aaa aat att ttg gaa tca ttc ttt acc	1008
Thr Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Glu Ser Phe Phe Thr	
325 330 335	
15 ggt aaa ttt gat tac aga cca caa gat att atc tta tta aat ggt gaa	1056
Gly Lys Phe Asp Tyr Arg Pro Gln Asp Ile Ile Leu Leu Asn Gly Glu	
340 345 350	
20 tac gtt act aaa gct tac ggt aaa cac gat aag aaa taa	1095
Tyr Val Thr Lys Ala Tyr Gly Lys His Asp Lys Lys	
355 360	
25 <210> 8	
<211> 364	
<212> PRT	
25 <213> Candida boidinii	
<400> 8	
30 Met Lys Ile Val Leu Val Leu Tyr Asp Ala Gly Lys His Ala Ala Asp	
1 5 10 15	
35 Glu Glu Lys Leu Tyr Gly Ser Thr Glu Asn Lys Leu Gly Ile Ala Asn	
20 25 30	
35 Trp Leu Lys Asp Gln Gly His Glu Leu Ile Thr Thr Ser Asp Lys Glu	
35 40 45	
40 Gly Glu Thr Ser Glu Leu Asp Lys His Ile Pro Asp Ala Asp Ile Ile	
50 55 60	
45 Ile Thr Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Ile Thr Lys Glu Arg Leu Asp	
65 70 75 80	
50 Lys Ala Lys Asn Leu Lys Leu Val Val Val Ala Gly Val Gly Ser Asp	
85 90 95	
55 His Ile Asp Leu Asp Tyr Ile Asn Gln Thr Gly Lys Lys Ile Ser Val	
100 105 110	
Leu Glu Val Thr Gly Ser Asn Val Val Ser Val Ala Glu His Val Val	
115 120 125	

Met Thr Met Leu Val Leu Val Arg Asn Phe Val Pro Ala His Glu Gln
130 135 140

5 Ile Ile Asn His Asp Trp Glu Val Ala Ala Ile Ala Lys Asp Ala Tyr
145 150 155 160

10 Asp Ile Glu Gly Lys Thr Ile Ala Thr Ile Gly Ala Gly Arg Ile Gly
165 170 175

15 Tyr Arg Val Leu Glu Arg Leu Leu Pro Phe Asn Pro Lys Glu Leu Leu
180 185 190

20 Tyr Tyr Asp Tyr Gln Ala Leu Pro Lys Glu Ala Glu Glu Lys Val Gly
195 200 205

25 Ala Arg Arg Val Glu Asn Ile Glu Glu Leu Val Ala Gln Ala Asp Ile
210 215 220

30 Val Thr Val Asn Ala Pro Leu His Ala Gly Thr Lys Gly Leu Ile Asn
225 230 235 240

35 Lys Glu Leu Leu Ser Lys Phe Lys Lys Gly Ala Trp Leu Val Asn Thr
245 250 255

40 Ala Arg Gly Ala Ile Ala Val Ala Glu Asp Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

45 Ser Gly Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro
275 280 285

50 Ala Pro Lys Asp His Pro Trp Arg Asp Met Arg Asn Lys Tyr Gly Ala
290 295 300

55 Gly Asn Ala Met Thr Pro His Tyr Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ala Gln
305 310 315 320

50 Thr Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Glu Ser Phe Phe Thr
325 330 335

55 Gly Lys Phe Asp Tyr Arg Pro Gln Asp Ile Ile Leu Leu Asn Gly Glu
340 345 350

Tyr Val Thr Lys Ala Tyr Gly Lys His Asp Lys Lys
355 360

5	<210> 9 <211> 5686 <212> DNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Plasmid pAM3.25	
15	<400> 9 tatgaagatt gtcttagttc tttatgatgc tggtaagcac gctgctgatg aagaaaaatt atatggttct actgaaaata aattaggtat tgctaattgg ttaaaaagatc aaggtcatga	60 120
20	actaattact acttctgata aagaaggtga aacaagtcaa ttggataaac atatcccaga tgctgatatt atcatcacca ctccttcca tcctgcttat atcactaagg aaagacttga	180 240
25	caaggctaag aactaaaaat tagtcgttgt cgctggtgtt ggttctgatc acattgattt agattatatt aatcaaacag gtaagaaaat ctcagtcctg gaagttacag gttctaattgt	300 360
30	tgtctctgtt gctgaacacg ttgtcatgac catgcttgc ttggtagaa atttcgttcc agcacatgaa caaattatta accacgattt ggagggtgt gctatcgcta aggatgctta	420 480
35	cgtatcgaa ggtaaaacta tcgctaccat tggtgcttgtt agaattggtt acagagtctt ggaaagatta ctcccattta atccaaaaga attattatac tacgattatc aagcttacc	540 600
40	aaaagaagct gaagaaaaag ttgggtcttag aagagttgaa aatattgaag aattagttgc tcaagctgat atcgttacag ttaatgctcc attacacgca ggtacaaaag gtttaattaa	660 720
45	taaggaatta ttatctaaat ttaaaaaagg tgcttggta gtcaataccg caagaggtgc tattgctgtt gctgaagatg ttgcagcagc tttagaatct ggtcaattaa gaggttacgg	780 840
50	tggtgatgtt tggttcccac aaccagctcc aaaggatcac ccatggagag atatgagaaa taaatatggt gctggtaatg ccatgactcc tcactactt ggtactactt tagacgctca	900 960
55	aacaagatac gctgaaggta ctaaaaatat tttggaatca ttcttaccg gtaaaatttga ttacagacca caagatatta tcttattaaa tggtgaatac gttactaaag cttacggtaa	1020 1080
	acacgataag aaataagacg tcaagcttgg ctgtttggc ggatgagaga agatttcag	1140
	cctgatacag attaaatcag aacgcagaag cggtctgata aaacagaatt tgccctggcgg	1200
	cagtagcgcg gtggtcccac ctgacccat gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc	1260
	cgtatggtagt gtgggggtctc cccatgcgag agtagggAAC tgccaggcat caaataaaac	1320
	gaaaggctca gtcgaaagac tgggccttgc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc	1380
	tcctgagtag gacaaatccg cggggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccgag	1440

	ggtggcgggc aggacgccc ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc	1500
	tgacggatgg ccttttgag tttctacaaa ctctttgtt tattttcta aatacattca	1560
5	aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg	1620
	aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc cctttttgc ggcattttgc	1680
10	cttcctgttt ttgctcaccc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg	1740
	ggtgacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagttt	1800
	cgccccgaag aacgtttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgccgta	1860
15	ttatccgtg ttgacgccc gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat	1920
	gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga	1980
20	gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca	2040
	acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct ttttgcaca acatggggga tcatgttaact	2100
	cgccctgatc gttggaaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc	2160
25	acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaaactat taactggcga actacttact	2220
	ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt	2280
	ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt	2340
30	gggtctcgcg gtatcattgc agcaactggg ccagatggta agccctcccg tatacgtagtt	2400
	atctacacga cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata	2460
35	ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tataactttag	2520
	attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgcataat	2580
40	ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa	2640
	aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt ttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca	2700
	aaaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt ttgccggatc aagagctacc aactctttt	2760
45	ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agttagccg	2820
	tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcg tctgctaattc	2880
	ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga	2940
50	cgtatgttac cggataaggc gcagcggcgtc ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc	3000
	agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agataacctac agcgtgagct atgagaaagc	3060
55	gccacgcttc ccgaaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgaaaca	3120
	ggagagcgca cgagggagct tccaggggaa aacgcctggt atctttatag tccctgtcggg	3180
	tttcgcacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgtatgct cgtcaggggg gcggagccta	3240

	tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta cggttcctgg cctttgctg gcctttgct	3300
5	cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcccttgag	3360
	tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgcgca gcgagtcagt gagcgaggaa	3420
	gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcata tgtgcgttat ttcacaccgc	3480
10	atatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaaac cagtatacac	3540
	tccgctatcg ctacgtgact gggcatggc tgcccccga caccgccaa caccgcgtga	3600
15	cgccctga cgggcttgct tgctccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc	3660
	cgggagctgc atgtgtcaga ggtttcacc gtcatcacccg aaacgcgcga ggcagctgct	3720
20	gtaaagctca tcagcgtggc cgtgaagcga ttcacagatg tctgcctgtt catccgcgtc	3780
	cagctcggtt agtttctcca gaagcgtaa tgtctggctt ctgataaaacg gggccatgtt	3840
	aagggcggtt tttcctgtt tggtcacttg atgcctccgt gtaaggggaa atttctgttc	3900
25	atggggtaa tgataaccat gaaacgagag aggtgctca cgatacgggt tactgatgat	3960
	gaacatgccc gtttactgga acgttgtgag gtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg	4020
	gaccagagaa aaatcactca gggtaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgttaggttt	4080
30	ccacagggta gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct	4140
	gacttccgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tggtgttgct	4200
35	caggtcgcag acgtttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgctat cggtgattca	4260
	ttctgctaacc cagtaaggca accccgcccag cctagccggg tcctcaacga caggagcaccg	4320
	atcatgcgca cccgtggcca ggacccaacg ctgcccggaa tgcggcggt gcccgtgt	4380
40	gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg tttgcgcatt cacagttctc	4440
	cgcaagaatt gattggctcc aattcttggc gtggtaatc cgtagcggag gtgcggccgg	4500
	cttccattca ggtcgaggtg gcccggctcc atgcaccgcg acgcaacgcg gggaggcaga	4560
45	caaggtatag ggccggcgcat acaatccatg ccaacccgtt ccatgtgctc gccgaggcgg	4620
	cataaaatcgc cgtgacgatc agcggtccag tgatcgaagt taggctggta agagccgcga	4680
50	gcgatccttgc aagctgtccc tgatggctgt catctacctg cctggacagc atggcctgca	4740
	acgcgggcat cccgatgccc ccggaaagcga gaagaatcat aatggggaaag gccatccagc	4800
55	ctcgctcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgctc ggccgcccattc ccggcgataa	4860
	tggcctgctt ctcgcccggaa cgtttgggtgg cgggaccagt gacgaaggct tgagcgagg	4920
	cgtgcaagat tccgaataacc gcaagcgcaca ggccgatcat cgtcgcgtc cagcgaagc	4980

ggtcctcgcc	gaaaatgacc	cagagcgctg	ccggcacctg	tcctacgagt	tgcatgataa	5040	
agaagacagt	cataagtgcg	gcgacgatag	tcatgccccg	cgcccaccgg	aaggagctga	5100	
5	ctgggttcaa	ggctctcaag	ggcatcggtc	gacgctctcc	cttatgcac	tcctgcatta	5160
ggaagcagcc	cagtagtagg	ttgaggccgt	tgagcaccgc	cgccgcaagg	aatggtgcat	5220	
10	gctcgatggc	tacgagggca	gacagtaagt	ggatttacca	taatccctta	attgtacgca	5280
ccgctaaaac	gcgttcagcg	cgatcacggc	gcagacagg	taaaaaatggc	aacaaaccac	5340	
cctaaaaact	gcgcgatcgc	gcctgataaa	ttttaaccgt	atgaatacct	atgcaaccag	5400	
15	agggtacagg	ccacattacc	cccacttaat	ccactgaagc	tgccattttt	catggttca	5460
ccatcccagc	gaagggccat	gcatgcacg	aaattaatac	gacgaaatta	atacgactca	5520	
ctataggcgca	attgcgatca	ccacaattca	gcaaattgtg	aacatcatca	cgttcatctt	5580	
tccctggttg	ccaatggccc	atttcctgt	cagtaacgag	aaggtcgcga	attcaggcgc	5640	
tttttagact	ggtcgtaatg	aacaattctt	aagaaggaga	tataca		5686	
25	<210>	10					
<211>	5106						
<212>	DNA						
<213>	Artificial						
30	<220>						
<223>	Plasmid pAM10.1						
35	<400>	10					
gaaggagata	tacatatgac	attagaaatc	ttcgaatact	tagaaaaata	tgattatgag	60	
caagtagtat	tttgtcaaga	taaagaatct	ggtttaaaag	caattattgc	aattcatgat	120	
acaacacttg	gaccggctct	tggtggaaca	agaatgtgga	catatgattc	tgaagaagcg	180	
gcgattgaag	atgcattgcg	tcttgcaaaa	gggatgacat	acaaaaacgc	agcagctggt	240	
ttaaacttag	gtggtgcgaa	aacagtaatt	atcggtgatc	ctcgtaaaga	taagagcgaa	300	
45	gcaatgttcc	gtgcactagg	acgttatatc	caaggactaa	acggacgtta	cattacagct	360
gaagatgttgc	gtacaacagt	agatgatatg	gatattatcc	atgaagaaac	tgactttgt	420	
50	acaggtatct	caccatcatt	cggttcttct	ggtaaccat	ctccggtaac	tgcatacggt	480
gtttaccgtg	gtatgaaagc	agctgcaaaa	gaagctttcg	gtactgacaa	tttagaagga	540	
aaagtaatttgc	ctgttcaagg	cgttggtaac	gtagcatatc	acctatgcaa	acatttacac	600	
55	gctgaaggag	caaaattaat	tgttacagat	attaataaag	aagctgtaca	acgtgctgta	660
gaagaattcg	gtgcactagg	cgcaacagtt	aatgatgaaa	ctattccaca	acttaaagca	720	
tacgcaccat	gtgcactagg	cgcaacagtt	aatgatgaaa	ctattccaca	acttaaagca	780	

	aaagtaatcg caggttctgc gaataaccaa ttaaaagaag atcgcatgg tgacatcatt	840
5	catgaaatgg gtattgtata cgccaccagat tatgttaatta atgcaggtgg cgtaattaac	900
	gtagcagacg aatttatatgg atacaataga gaacgtgcac taaaacgtgt tgagtctatt	960
	tatgacacga ttgcaaaagt aatcgaaatt tcaaaaacgcg atggcatagc aacttatgta	1020
10	gcggcagatc gtctagctga agagcgcatt gcaagcttga agaattctcg tagcacttac	1080
	ttacgcaacg gtcacgatat tattagccgt cgctaacgcg tttgcgggttg gcaaaatggc	1140
15	gcagcagcaa ggcgtggcgg tgaaaacctc tgccgaagcc ctgcaacagg ccattgacga	1200
	taatttctgg caagccgaat accgcgacta ccgcccgtacc tccatctaaa agcttatacgta	1260
20	tgataagctg tcaaaacatga gaattacaac ttatatcgta tggggctgac ttcaggtgct	1320
	acatttgaag agataaaattt cactgaaatc tagaaaatatt ttatctgatt aataagatga	1380
	tcttcttgag atcggtttgg tctgcgcgtt atctcttgct ctgaaaacgaa aaaaaccgccc	1440
25	ttgcagggcg gtttttcgaa gtttctctga gctaccaact ctttgaaccg aggttaactgg	1500
	cttggaggag cgcaagtcacc aaaacttgc tttcagttt agccttaacc ggccatgac	1560
	ttcaagacta actcctctaa atcaattacc agtggctgct gccagtggtg cttttgcatt	1620
30	tcttccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag ggcgcagcggt cggactgaac	1680
	ggggggttcg tgcatacagt ccagcttggaa gcaactgccc tacccggaaac tgagtgtcag	1740
35	gcgtggaatg agacaaacgc ggcataaca gcgaaatgac accggtaaac cgaaaggcag	1800
	gaacaggaga ggcacgagg gagccggccag gggaaacgccc tggtatcttt atagtcctgt	1860
40	cgggtttcgc caccactgat ttgagcgtca gatttcgtga tgcttgcag gggggcggag	1920
	cctatggaaa aacggctttg ccgcggccct ctcacttccc tgttaagtat cttcctggca	1980
	tcttccagga aatctccgca ccgttcgtaa gccatttccg ctgcggcag tcgaacgacc	2040
45	gagcgtagcg agtcagttag cgaggaagcg gaatataatcc tgtatcacat attctgtca	2100
	cgcacccgtg cagcctttt ttcactgcca catgaagcac ttcaactgaca ccctcatcag	2160
	tgccaaacata gtaagccagt atacactccg ctgcgtca tgtccggcgg tgctttgcc	2220
50	gttacgcacc accccgtcag tagctgaaca ggagggacag ctgatagaaa cagaagccac	2280
	tggagcacct caaaaacacc atcatacact aaatcagtaa gttggcagca tcacccgacg	2340
55	cactttgcgc cgaataaaata cctgtgacgg aagatcactt cgcagaataa ataaatcctg	2400
	gtgtccctgt tgataccggg aagccctggg ccaacttttg gcgaaaatga gacgttgatc	2460
	ggcacgtaaag aggttccaaac tttcaccata atgaaataag atcactaccg ggcgtatttt	2520

	ttgagttatc gagatttca ggagctaagg aagctaaaat ggagaaaaaa atcactggat	2580
	ataccaccgt tgatataatcc caatggcatc gtaaagaaca ttttggaggca tttcagtcag	2640
5	ttgctcaatg tacctataac cagaccgttc agctggatat tacggccttt taaagacccg	2700
	taaagaaaaaa taagcacaag ttttatccgg cctttattca cattcttgcc cgccctgatga	2760
10	atgctcatcc ggaattccgt atggcaatga aagacggtga gctggtgata tgggatagtg	2820
	ttcaccccttgc ttacaccgtt ttccatgagc aaactgaaac gttttcatcg ctctggagtg	2880
	aataccacga cgatttccgg cagtttctac acatataattc gcaagatgtg gcgtgttacg	2940
15	gtgaaaacct ggcctatttc cctaaagggt ttattgagaa tatgttttc gtctcagcca	3000
	atccctgggt gagtttcacc agtttgatt taaacgtggc caatatggac aacttcttcg	3060
20	cccccggtt caccatgggc aaatattata cgcaaggcga caaggtgctg atgcccgtgg	3120
	cgattcaggt tcacatgcc gtcgtgatg gttccatgt cggcagaatg cttaatgaat	3180
	tacaacagta ctgcgtatgag tggcagggcg gggcgttaatt ttttaaggc agttattgg	3240
25	gcccttaaac gcctgggtgc acgcctgaat aagtgataat aagcggatga atggcagaaa	3300
	ttcgaaagca aattcgaccc ggtcgctggc tcagggcagg gtcgttaat agccgcttat	3360
	gtctattgct ggttaccgg tttattgact accggaagca gtgtgaccgt gtgttctca	3420
30	aatgcctgag gccagttgc tcaggcttc cccgtggagg taataattga cgatatgatc	3480
	atttattctg cctcccagag cctgataaaa acggtagcg cttcgtaat acagatgtag	3540
35	gtgttccaca gggtagccag cagcatcctg cgatgcagat ccggAACATA atggtgcagg	3600
	gcgcgtttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc cggggactg ttggcgctg	3660
	ccggcacctg tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag	3720
40	tcatgccccg cggccaccgg aaggagctac cggacagcgg tgccgactgt tgtaactcag	3780
	aataagaaaat gaggccgctc atggcggtga ctctcagtc tagtacgtg gtatcaccgg	3840
45	ttggttccac tctctgtgc gggcaacttc agcagcacgt agggacttc cgcgtttcca	3900
	gactttacga aacacggaaa ccgaagacca ttcatgttgt tgctcaggta gcagacgttt	3960
	tgcagcagca gtcgcttcac gttcgctcgc gtatcggtga ttcattctgc taaccagtaa	4020
50	ggcaaccccg ccagcctagc cgggtcctca acgacaggag cacgatcatg cgcacccgtg	4080
	gccaggaccc aacgctgccc gagatgcgcc gcgtgcggct gctggagatg gcggacgcga	4140
55	tggatatgtt ctgccaagggt ttggtttgcg cattcacagt tctccgcaag aattgattgg	4200
	ctccaaattct tggagtgggt aatccgttag cgaggtgccg ccggcttcca ttcaggtcga	4260
	ggtgcccccgg ctccatgcac cgcgacgcaa cgcggggagg cagacaaggt atagggcggc	4320

5	gcctacaatc catgccaacc cgttccatgt gctcgccgag gcggcataaa tcgcccgtgac	4380
	gatcagcggt ccagtgatcg aagttaggct ggtaagagcc gcgagcgatc cttgaagctg	4440
	tccctgatgg tcgtcatcta cctgcctgga cagcatggcc tgcaacgcgg gcatcccgat	4500
	gcccggaa gcgagaagaa tcataatggg gaaggccatc cagcctcgcg tcgcaacgc	4560
10	cagcaagacg tagcccagcg cgtcgccgc catgcccgcg ataatggcct gtttcgc	4620
	gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa ggctttagcg agggcgtgca agattccgaa	4680
15	taccgcaagc gacaggccga tcatcgctgc gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat	4740
	gaccaggagc gctgcccggca cctgtcctac gagttgcattg ataaagaaga cagtcataag	4800
	tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcccc caaggaaaggag ctgactgggt tgaaggctct	4860
20	caagggcatc ggtcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagttag	4920
	tagttgagg ccgtttagca ccgcccggc aaggaatggt gcatgcatcg atcaccacaa	4980
25	ttcagcaaat tgcgtacatc atcacgttca tctttccctg gttgccaatg gcccattttc	5040
	ctgtcagtaa cgagaaggtc gcgaattcag gcgatccat gactggcgt aatgaacaat	5100
	tcttaa	5106
30	<210> 11	
	<211> 5597	
	<212> DNA	
	<213> Unknown	
35	<220>	
	<223> Plasmid	
40	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (25) .. (1749)	
	<223> scfA - malic enzyme gene	
45	<400> 11	
	aattcttaag aaggagatat acat atg gat att caa aaa aga gtg agt gac	
	Met Asp Ile Gln Lys Arg Val Ser Asp	
	1 5	
50	atg gaa cca aaa aca aaa aaa cag cgt tcg ctt tat atc cct tac gct	99
	Met Glu Pro Lys Thr Lys Lys Gln Arg Ser Leu Tyr Ile Pro Tyr Ala	
10	15 20 25	
55	ggc cct gta ctg ctg gaa ttt ccg ttg ttg aat aaa ggc agt gcc ttc	147
	Gly Pro Val Leu Leu Glu Phe Pro Leu Leu Asn Lys Gly Ser Ala Phe	
	30 35 40	

195	agc atg gaa gaa cgc cgt aac ttc aac ctg ctg ggg tta ctg ccg gaa Ser Met Glu Glu Arg Arg Asn Phe Asn Leu Leu Gly Leu Leu Pro Glu 45 50 55
243	5 gtg gtc gaa acc atc gaa gaa caa gcg gaa cga gca tgg atc cag tat Val Val Glu Thr Ile Glu Glu Gln Ala Glu Arg Ala Trp Ile Gln Tyr 60 65 70
291	10 cag gga ttc aaa acc gaa atc gac aaa cac atc tac ctg cgt aac atc Gln Gly Phe Lys Thr Glu Ile Asp Lys His Ile Tyr Leu Arg Asn Ile 75 80 85
339	15 cag gac act aac gaa acc ctc ttc tac cgt ctg gta aac aat cat ctt Gln Asp Thr Asn Glu Thr Leu Phe Tyr Arg Leu Val Asn Asn His Leu 90 95 100 105
387	gat gag atg atg cct gtt att tat acc cca acc gtc ggc gca gcc tgt Asp Glu Met Met Pro Val Ile Tyr Thr Pro Thr Val Gly Ala Ala Cys 110 115 120
435	20 gag cgt ttt tct gag atc tac cgc cgt tca cgc ggc gtg ttt atc tct Glu Arg Phe Ser Glu Ile Tyr Arg Ser Arg Gly Val Phe Ile Ser 125 130 135
483	25 tac cag aac cgg cac aat atg gac gat att ctg caa aac gtg ccg aac Tyr Gln Asn Arg His Asn Met Asp Asp Ile Leu Gln Asn Val Pro Asn 140 145 150
531	30 cat aat att aaa gtg att gtg gtg act gac ggt gaa cgc att ctg ggg His Asn Ile Lys Val Ile Val Val Thr Asp Gly Glu Arg Ile Leu Gly 155 160 165
579	35 ctt ggt gac cag ggc atc ggc ggg atg ggc att ccg atc ggt aaa ctg Leu Gly Asp Gln Gly Ile Gly Met Gly Ile Pro Ile Gly Lys Leu 170 175 180 185
627	40 tcg ctc tat acc gcc tgg ggc atc agc ccg gcg tat acc ctt ccg Ser Leu Tyr Thr Ala Cys Gly Ile Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Pro 190 195 200
675	45 gtg gtg ctg gat gtc gga acg aac aac caa cag ctg ctt aac gat ccg Val Val Leu Asp Val Gly Thr Asn Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Pro 205 210 215
723	50 ctg tat atg ggc tgg cgt aat ccg cgt atc act gac gac gaa tac tat Leu Tyr Met Gly Trp Arg Asn Pro Arg Ile Thr Asp Asp Glu Tyr Tyr 220 225 230
771	55 gaa ttc gtt gat gaa ttt atc cag gct gtg aaa caa cgc tgg cca gac Glu Phe Val Asp Glu Phe Ile Gln Ala Val Lys Gln Arg Trp Pro Asp 235 240 245
819	60 gtg ctg ttg cag ttt gaa gac ttt gct caa aaa aat gcg atg ccg tta Val Leu Leu Gln Phe Glu Asp Phe Ala Gln Lys Asn Ala Met Pro Leu 250 255 260 265
867	65 ctt aac cgc tat cgc aat gaa att tgt tct ttt aac gat gac att cag Leu Asn Arg Tyr Arg Asn Glu Ile Cys Ser Phe Asn Asp Asp Ile Gln 270 275 280

ggc act gcg gcg gta aca gtc ggc aca ctg atc gca gca agc cgc gcg	915
Gly Thr Ala Ala Val Thr Val Gly Thr Leu Ile Ala Ala Ser Arg Ala	
285 290 295	
5 gca ggt ggt cag tta agc gag aaa aaa atc gtc ttc ctt ggc gca ggt	963
Ala Gly Gly Gln Leu Ser Glu Lys Lys Ile Val Phe Leu Gly Ala Gly	
300 305 310	
10 tca gcg gga tgc ggc att gcc gaa atg atc atc tcc cag acc cag cgc	1011
Ser Ala Gly Cys Gly Ile Ala Glu Met Ile Ile Ser Gln Thr Gln Arg	
315 320 325	
15 gaa gga tta agc gag gaa gcg gcg cgg cag aaa gtc ttt atg gtc gat	1059
Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Arg Gln Lys Val Phe Met Val Asp	
330 335 340 345	
0 cgc ttt ggc ttg ctg act gac aag atg ccg aac ctg ctg cct ttc cag	1107
Arg Phe Gly Leu Leu Thr Asp Lys Met Pro Asn Leu Leu Pro Phe Gln	
350 355 360	
20 acc aaa ctg gtg cag aag cgc gaa aac ctc agt gac tgg gat acc gac	1155
Thr Lys Leu Val Gln Lys Arg Glu Asn Leu Ser Asp Trp Asp Thr Asp	
365 370 375	
25 agc gat gtg ctg tca ctg ctg gat gtg gtg cgc aat gta aaa cca gat	1203
Ser Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Val Val Arg Asn Val Lys Pro Asp	
380 385 390	
30 att ctg att ggc gtc tca gga cag acc ggg ctg ttt acg gaa gag atc	1251
Ile Leu Ile Gly Val Ser Gly Gln Thr Gly Leu Phe Thr Glu Glu Ile	
395 400 405	
35 atc cgt gag atg cat aaa cac tgt ccg cgt ccg atc gtg atg ccg ctg	1299
Ile Arg Glu Met His Lys His Cys Pro Arg Pro Ile Val Met Pro Leu	
410 415 420 425	
0 tct aac ccg acg tca cgc gtg gaa gcc aca ccg cag gac att atc gcc	1347
Ser Asn Pro Thr Ser Arg Val Glu Ala Thr Pro Gln Asp Ile Ile Ala	
430 435 440	
45 tgg acc gaa ggt aac gcg ctg gtc gcc acg ggc agc ccg ttt aat cca	1395
Trp Thr Glu Gly Asn Ala Leu Val Ala Thr Gly Ser Pro Phe Asn Pro	
445 450 455	
50 gtg gta tgg aaa gat aaa atc tac cct atc gcc cag tgt aac aac gcc	1443
Val Val Trp Lys Asp Lys Ile Tyr Pro Ile Ala Gln Cys Asn Asn Ala	
460 465 470	
55 ttt att ttc ccg ggc atc ggc ctg ggt gtt att gct tcc ggc gcg tca	1491
Phe Ile Phe Pro Gly Ile Gly Leu Gly Val Ile Ala Ser Gly Ala Ser	
475 480 485	
cgt atc acc gat gag atg ctg atg tcg gca agt gaa acg ctg gcg cag	1539
Arg Ile Thr Asp Glu Met Leu Met Ser Ala Ser Glu Thr Leu Ala Gln	
490 495 500 505	

tat tca cca ttg gtg ctg aac ggc gaa ggt atg gta ctg ccg gaa ctg Tyr Ser Pro Leu Val Leu Asn Gly Glu Gly Met Val Leu Pro Glu Leu 510 515 520	1587
5 aaa gat att cag aaa gtc tcc cgc gca att gcg ttt gcg gtt ggc aaa Lys Asp Ile Gln Lys Val Ser Arg Ala Ile Ala Phe Ala Val Gly Lys 525 530 535	1635
10 atg gcg cag cag caa ggc gtg gcg gtg aaa acc tct gcc gaa gcc ctg Met Ala Gln Gln Gly Val Ala Val Lys Thr Ser Ala Glu Ala Leu 540 545 550	1683
15 caa cag gcc att gac gat aat ttc tgg caa gcc gaa tac cgc gac tac Gln Gln Ala Ile Asp Asp Asn Phe Trp Gln Ala Glu Tyr Arg Asp Tyr 555 560 565	1731
20 cgc cgt acc tcc atc taa aagcttatcg atgataagct gtcaaacatg Arg Arg Thr Ser Ile 570	1779
25 agaattacaa cttatatcgat atggggctga cttcaggtgc tacattgaa gagataaatt gcactgaaat ctagaaatat tttatctgat taataagatg atcttcttga gatcgtttg	1839 1899
30 25 gtctgcgcgt aatctcttgc tctgaaaacg aaaaaaccgc cttgcagggc ggttttcga aggttctctg agctaccaac tctttgaacc gaggttaactg gcttggagga ggcgcagtcac caaaaacttgt ctttcagtt tagccttaac cggcgcatga cttcaagact aactcctcta aatcaattac cagtggtgc tgccagtggt gctttgcatt gtcttccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcggactgaa cggggggttc gtgcatacag	1959 2019 2079 2139 2199
35 35 tccagcttgg agcgaactgc ctacccggaa ctgagtgtca ggcgttggaa gagacaaacg cgccataac agcggaatga caccggtaaa ccgaaaggca ggaacaggag agcgcacgag ggagccgcca gggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccaccactga tttgagcgtc agatccgtg atgctgtca gggggcggaa gcctatggaa aaacggcttt	2259 2319 2379 2439
40 45 45 gccgcggccc tctcacttcc ctgttaagta tcttcctggc atttccagg aaatctccgc cccgttcgtta agccatttcc gtcggccgca gtcgaacgc acgacccggc gcaacgttt gcgaggaagc ggaatatatac ctgtatcaca tattctgtct acgcacccggc gcaacgttt tttccttgcc acatgaagca cttcactgac accctcatca gtgccaacat agtaagccag	2499 2559 2619 2679
45 50 50 tatacactcc gctagcgctg atgtccggcg gtgctttgc cgttacgcac cacccgtca gtagctgaac aggagggaca gctgatagaa acagaaggca ctggagcacc tcaaaaacac catcatacac taaatcagta agttggcagc atcacccgac gcactttgcg ccgaataaat	2739 2799 2859
55 55 55 acctgtgacg gaagatcact tcgcagaata aataaattcct ggtgtccctg ttgataccgg gaagccctgg gccaacttt ggcaaaatg agacgttgat cggcacgtaa gaggttccaa	2919 2979

	ctttcaccat aatgaaataa gatcactacc gggcgtattt tttgagttat cgagatttc	3039
5	aggagctaag gaagctaaaa tggagaaaaa aatcactgga tataccacccg ttgatatac	3099
	ccaatggcat cgtaaagaac atttgaggc atttcagtca gttgctcaat gtacctataa	3159
	ccagaccgtt cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaaagaaaa ataagcacaa	3219
10	gttttatccg gcctttattc acattctgc ccgcctgatg aatgctcatc cggaattccg	3279
	tatggcaatg aaagacggtg agctggtgat atgggatagt gttcaccctt gttacacccgt	3339
15	tttccatgag caaactgaaa cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgattccg	3399
	gcagtttcta cacatatatt cgcaagatgt ggctgttac ggtaaaaacc tggcctattt	3459
20	ccctaaaggg tttattgaga atatgtttt cgtctcagcc aatccctggg tgagttcac	3519
	cagtttgat ttaaacgtgg ccaatatgga caacttctc gccccgttt tcaccatggg	3579
	caaataattat acgcaaggcg acaagggtgct gatgccgctg gcgattcagg ttcatcatgc	3639
25	cgtctgtat ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgatga	3699
	gtggcagggc gggcgtaat ttttaagg cagttattgg tgcccttaaa cgccctggc	3759
	tacgcctgaa taagtgataa taagcggatg aatggcagaa attcgaaagc aaattcgacc	3819
30	cggtcgtcgg ttcaaggcag ggtcgtaaa tagccgctta tgtctattgc tggtttaccg	3879
	gtttattgac taccggaagc agtgtgaccg tgtgcttctc aaatgcctga ggccagtttgc	3939
35	ctcaggctct ccccggtggag gtaataattg acgatatgat catttattct gcctcccaga	3999
	gcctgataaa aacgggttagc gttcgtaa tacagatgta ggtgttccac agggtagcca	4059
40	gcagcatcct gcgatgcaga tccggAACat aatggtgca ggcgcttgc tgccgtggg	4119
	tatggtggca ggccccgtgg ccggggact gttggcgct gccggcacct gtcctacgag	4179
	ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata gtcatgcccc gcccacccg	4239
45	gaaggagcta ccggacagcg gtgcggactg ttgtaactca gaataagaaa tgaggccgct	4299
	catggcggtt actctcagtc atagtatcgt ggtatcaccg gttggttcca ctctctgttg	4359
	cgggcaactt cagcagcactg tagggactt ccgcgtttcc agactttacg aaacacggaa	4419
50	accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgccagacgat ttgcagcagc agtcgcttca	4479
	cgttcgctcg cgtatcggtt attcattctg ctaaccagta aggcaacccc gccagcctag	4539
	ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat ggcacccgt ggccaggacc caacgctgcc	4599
55	cgagatgcgc cgcgtgcggc tgctggagat ggcggacgca atggatatgt tctgccaagg	4659
	gttggtttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgatttgc gctccaattc ttggagtggt	4719

gaatccgtta	gcgaggtgcc	gccggcttcc	attcaggtcg	aggtgccccg	gctccatgca	4779	
ccgcgacgca	acgcggggag	gcagacaagg	tatagggcgg	cgcctacaat	ccatgccaac	4839	
5	ccgttccatg	tgctcgccga	ggcggcataa	atcgccgtga	cgatcagcgg	tccagtgatc	4899
	gaagtttaggc	tggtaagagc	cgcgagcgat	ccttgaagct	gtccctgatg	gtcgtcatct	4959
10	acctgcctgg	acagcatggc	ctgcaacgcg	ggcatcccga	tgccgcccga	agcgagaaga	5019
	atcataatgg	ggaaggccat	ccagcctcgc	gtcgcgaaacg	ccagcaagac	gtagcccagc	5079
	gcgtcggccg	ccatgccggc	gataatggcc	tgcttctcgc	cgaaacgttt	ggtggcggga	5139
15	ccagtgcacga	aggcttgagc	gagggcgtgc	aagattccga	ataccgcaag	cgacaggccg	5199
	atcatcgctg	cgctccagcg	aaagcggtcc	tcgcccaaaa	tgaccagag	cgctgccggc	5259
	acctgtccta	cgagttgcat	gataaagaag	acagtctaaa	gtcgccgac	gatagtcatg	5319
	cccccgcccc	accggaagga	gctgactggg	ttgaaggctc	tcaagggcat	cggtcgacgc	5379
	tctcccttat	gcgactcctg	cattaggaag	cagcccagta	gtaggttgag	gccgttgagc	5439
25	accgcccggc	caaggaatgg	tgcatgcatac	gatcaccaca	attcagcaaa	ttgtgaacat	5499
	catcacgttc	atctttccct	ggttgc当地	ggcccatat	cctgtcagta	acgagaaggt	5559
	cgcgaattca	ggcgctttt	agactggtcg	taatgaac			5597
30							

<210> 12

<211> 574

<212> PRT

35 <213> Unknown

<220>

<223> Plasmid

0 <400> 12

Met	Asp	Ile	Gln	Lys	Arg	Val	Ser	Asp	Met	Glu	Pro	Lys	Thr	Lys	Lys
1						5			10				15		

45	Gln	Arg	Ser	Leu	Tyr	Ile	Pro	Tyr	Ala	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
									20			25		30		

50	Pro	Leu	Leu	Asn	Lys	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Met	Glu	Glu	Arg	Arg	Asn
									35		40		45			

55	Phe	Asn	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Pro	Glu	Val	Val	Glu	Thr	Ile	Glu	Glu
									50		55		60			

65	Gln	Ala	Glu	Arg	Ala	Trp	Ile	Gln	Tyr	Gln	Gly	Phe	Lys	Thr	Glu	Ile
									70		75		80			

Asp Lys His Ile Tyr Leu Arg Asn Ile Gln Asp Thr Asn Glu Thr Leu
85 90 95

5

Phe Tyr Arg Leu Val Asn Asn His Leu Asp Glu Met Met Pro Val Ile
100 105 110

10

Tyr Thr Pro Thr Val Gly Ala Ala Cys Glu Arg Phe Ser Glu Ile Tyr
115 120 125

15 Arg Arg Ser Arg Gly Val Phe Ile Ser Tyr Gln Asn Arg His Asn Met
130 135 140

0

Asp Asp Ile Leu Gln Asn Val Pro Asn His Asn Ile Lys Val Ile Val
145 150 155 160

Val Thr Asp Gly Glu Arg Ile Leu Gly Leu Gly Asp Gln Gly Ile Gly
165 170 175

25

Gly Met Gly Ile Pro Ile Gly Lys Leu Ser Leu Tyr Thr Ala Cys Gly
180 185 190

30

Gly Ile Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Pro Val Val Leu Asp Val Gly Thr
195 200 205

35 Asn Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Pro Leu Tyr Met Gly Trp Arg Asn
210 215 220

0

Pro Arg Ile Thr Asp Asp Glu Tyr Tyr Glu Phe Val Asp Glu Phe Ile
225 230 235 240

Gln Ala Val Lys Gln Arg Trp Pro Asp Val Leu Leu Gln Phe Glu Asp
245 250 255

45

Phe Ala Gln Lys Asn Ala Met Pro Leu Leu Asn Arg Tyr Arg Asn Glu
260 265 270

50

Ile Cys Ser Phe Asn Asp Asp Ile Gln Gly Thr Ala Ala Val Thr Val
275 280 285

55 Gly Thr Leu Ile Ala Ala Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gln Leu Ser Glu
290 295 300

Lys Lys Ile Val Phe Leu Gly Ala Gly Ser Ala Gly Cys Gly Ile Ala
305 310 315 320

5 Glu Met Ile Ile Ser Gln Thr Gln Arg Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala
325 330 335

10 Ala Arg Gln Lys Val Phe Met Val Asp Arg Phe Gly Leu Leu Thr Asp
340 345 350

Lys Met Pro Asn Leu Leu Pro Phe Gln Thr Lys Leu Val Gln Lys Arg
355 360 365

15 Glu Asn Leu Ser Asp Trp Asp Thr Asp Ser Asp Val Leu Ser Leu Leu
370 375 380

Asp Val Val Arg Asn Val Lys Pro Asp Ile Leu Ile Gly Val Ser Gly
385 390 395 400

25 Gln Thr Gly Leu Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Glu Met His Lys His
405 410 415

30 Cys Pro Arg Pro Ile Val Met Pro Leu Ser Asn Pro Thr Ser Arg Val
420 425 430

Glu Ala Thr Pro Gln Asp Ile Ile Ala Trp Thr Glu Gly Asn Ala Leu
435 440 445

35 Val Ala Thr Gly Ser Pro Phe Asn Pro Val Val Trp Lys Asp Lys Ile
450 455 460

Tyr Pro Ile Ala Gln Cys Asn Asn Ala Phe Ile Phe Pro Gly Ile Gly
465 470 475 480

45 Leu Gly Val Ile Ala Ser Gly Ala Ser Arg Ile Thr Asp Glu Met Leu
485 490 495

50 Met Ser Ala Ser Glu Thr Leu Ala Gln Tyr Ser Pro Leu Val Leu Asn
500 505 510

Gly Glu Gly Met Val Leu Pro Glu Leu Lys Asp Ile Gln Lys Val Ser
515 520 525

55 Arg Ala Ile Ala Phe Ala Val Gly Lys Met Ala Gln Gln Gln Gly Val
530 535 540

040055 AM

61

Ala Val Lys Thr Ser Ala Glu Ala Leu Gln Gln Ala Ile Asp Asp Asn
545 550 555 560

5 Phe Trp Gln Ala Glu Tyr Arg Asp Tyr Arg Arg Thr Ser Ile
565 570